

**Der Einfluß von 2,3-Diphosphoglyzerat
auf die Oxidationskinetik der Natriumnitrit- und
der Spontanoxidation von
fetalem und adultem Hämoglobin**

Norbert Merkel

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0046

Aus der Kinderklinik der Universität München
Dir. Prof. Dr. K. Betke

Der Einfluß von 2, 3-Diphosphoglyzerat auf die Oxidationskinetik
der Natriumnitrit- und der Spontanoxidation von fetalem und
adultem Hämoglobin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Norbert Merkel
aus
Bayreuth

1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Riegel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Betke
3. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sies
Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 10. 1975



Gliederung

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Material und Methoden</u>	2
1. Material	2
1.1. Hämoglobinlösungen	2
1.2. 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG)	3
1.3. Triäthanolamin-HCl-Puffer (TRAP)	3
1.4. Natriumnitrit (NaNO_2)	3
2. Methoden	4
2.1. Methode zur Bestimmung der Hämoglobin- konzentration	4
2.2. Methode zur Bestimmung der Methämoglobin- konzentration	4
2.3. Meßmethode und Meßvorgang	5
3. Durchführung der Versuche	8
3.1. Arbeitsschritte, die zu den angestrebten Küvetten- konzentrationen führen	8
3.2. Versuchsdurchführung und Auswertung der Versuche	10
III. <u>Resultate</u>	12
1. NaNO_2 -Oxidation von Hämoglobinen	12
1.1. NaNO_2 -Oxidation von Hämoglobinen bei 25° C und Luftatmosphäre	12
1.1.1. NaNO_2 -Oxidation von adultem Hämoglobin (Hb-A) bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzen- tration, in Luftatmosphäre	12
1.1.1.1. NaNO_2 -Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämo- lysaten bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG- Konzentration, in Luftatmosphäre	12
1.1.1.2. NaNO_2 -Oxidation von chromatographierten Hb-A-Lösungen bei 25° C, mit steigender 2,3- DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre	13
1.1.1.3. Vergleich der NaNO_2 -Oxidation von chromato- graphierten und dialysierten Hb-A-Lösungen bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzentra- tion, in Luftatmosphäre	13

II

	Seite
1.1.2. NaNO_2 -Oxidation von chromatographisch isoliertem Hb-F bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre	14
1.1.3. Vergleich der NaNO_2 -Oxidation von chromatographiertem Hb-A und Hb-F bei 25° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre	14
1.2. NaNO_2 -Oxidation von Hämoglobinen bei 37° C und Luftatmosphäre	15
1.2.1. NaNO_2 -Oxidation von dialysiertem Hb-A bei 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre	15
1.2.2. NaNO_2 -Oxidation von Hb-F bei 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre	15
1.3. NaNO_2 -Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten in Sauerstoffatmosphäre ($p\text{O}_2 = 700$ Torr), bei 25° C und 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG (Abb.5)	17
1.4. Vergleich der NaNO_2 -Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten in Luft- und Sauerstoffatmosphäre bei 25° C und 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG	17
1.5. NaNO_2 -Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten bei 25° C, mit und ohne 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre, Verhältnis Nitrit : Häm = 4 : 1	18
1.6. pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hb-F	19
1.7. Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf die Reaktionsgeschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hb-F	20
1.8. pH-Konstanz im Reaktionsansatz bei den Hb-F-Lösungen	21
2. Spontanoxidation von Hämoglobinen	22
2.1. Spontanoxidation von Hb-A und Hb-F bei 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre	22
2.2. Spontanoxidation von Hb-A bei 25° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre	24
 IV. <u>Diskussion</u>	
1. Nitritoxidationsversuche	25
2. Spontanoxidationsversuche	28

III

	Seite
V. <u>Zusammenfassung</u>	31
1. Einfluß von 2,3-DPG auf die Nitritoxidation von Hämoglobin	31
2. Einfluß von 2,3-DPG auf die Spontanoxidation von Hämoglobin	31
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	32
VII. <u>Anhang</u> Titrationskurve des 2,3-DPG	35
VIII. <u>Abbildungen</u>	36

I. Einleitung

Methämoglobinämien sind Erkrankungen, bei denen das Eisenatom des Ferro-Protoporphyrinteils des Hämoglobin nicht in zweiwertiger, sondern in dreiwertiger Form vorliegt. Dieses sogenannte Methämoglobin ist nicht mehr in der Lage Sauerstoff reversibel zu binden und hat somit keinen Anteil mehr an der Sauerstofftransportfunktion des Blutes.

Man unterscheidet kongenitale und erworbene Methämoglobinämien. Bei den ersteren kennt man solche, die ihre Ursache in einem Enzymdefekt haben und andere, denen eine Hb-M-Hämoglobinopathie zugrunde liegt. Medikamente, wie z.B. Phenacetin und Sulfonamide, oder chemische Substanzen, wie z.B. Nitrit, Chlorate oder Anilinderivate kommen als Grund für eine erworbene Methämoglobinämie in Betracht. Diese spielen vor allem im frühen Säuglingsalter eine Rolle. Junge Säuglinge neigen zur Methämoglobinämie. Die Ursache dieser erhöhten Empfindlichkeit sieht man in erster Linie in der leichteren Oxidierbarkeit des fetalen Hämoglobins (19).

Auf der Suche nach Substanzen, die auf die Oxidation von Fe^{II} zu Fe^{III} Einfluß nehmen könnten, wurde man auf das 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG) aufmerksam. Bei erblichen Methämoglobinämien findet man nämlich eine erhöhte 2,3-DPG-Konzentration in den Erythrocyten, wohl als Ausdruck einer Anpassung an die verminderte Gewebsoxygenation (26).

Aus früheren Untersuchungen weiß man, daß 2,3-DPG, das die Desoxyform des Hämoglobins begünstigt, einerseits die Kaliumferricyanidoxidation von Hämoglobin beschleunigt (31), andererseits im frühen Säuglingsalter in überdurchschnittlich hoher Konzentration im Erythrocyten vorliegt (30).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß des 2,3-DPG auf die Nitritoxidation von adultem und fetalem Hämoglobin zu Methämoglobin.

Diesen Resultaten werden die Ergebnisse entsprechender Spontanoxida-tionsversuche gegenübergestellt.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Hämoglobinlösungen

1.1.1. Hb-A-Hämoglobinlösungen

Die Hb-A-Hämoglobinlösungen wurden aus Erythrocyten von Erwachsenen-Blutkonserven hergestellt, die aufgrund der Lagerung bei pH 6,8 über 3 Wochen eine 2,3-DPG-Konzentration unter 0,5 mM enthielten. Für die Versuche wurde eine Hämoglobinlösung mit einer Ausgangshämoglobinkonzentration von 640 mg% benötigt.

Die Methämoglobinkonzentration dieser Hämoglobinlösungen betrug maximal 3 %.

1.1.1.1. Dialysierte Hb-A-Lösungen

Das Blut wird zweimal mit 0,9 % und anschließend einmal mit 1,2 % NaCl-Lösung gewaschen.

Den abzentrifugierten Blutbestandteilen wird das doppelte Volumen aqua dest. hinzugefügt. Anschließend wird geschüttelt bis Lackfarbenbildung eintritt.

Dieses Hämolsat wird mit dem doppelten Volumen CCl_4 -Lösung aufgefüllt und wiederum geschüttelt.

Nach scharfer Zentrifugation (15 min bei 4000 U/min) wird das klare Hämolsat abpipettiert und 24 Stunden lang bei 4° C gegen aqua dest. dialysiert.

1.1.1.2. Chromatographierte Hb-A-Lösungen

Nach osmotischer Hämolyse und Ausschütteln in CCl_4 (wie unter 1.1.1.1. beschrieben) wurde das Hämolsat 24 Stunden bei 4° C gegen TRIS-Puffer 0,05 M, pH 8,4 dialysiert. Während der Dialyse wurde das Hämolsat mit Sauerstoff durchperlt um einerseits die Bindung von 2,3-DPG an Desoxyhämoglobin zu vermeiden und andererseits die Methämoglobinbildung zu verlangsamen.

Durch Säulenchromatographie auf DEAE-Sephadex A-50, Particle Seize 40 - 120 μ wurde Hb-A₁ isoliert (10).

1.1.2. Hb-F-Hämoglobinlösungen

Es wurde vorhandenes Hb-F-Hämolysat verwendet, das durch Säulen-Chromatographie auf DEAE-Sephadex, A-50, Particle Seize 40 - 120 μ gewonnen wurde (10).

Es hatte eine Hämoglobinkonzentration zwischen 250 mg% und 600 mg%. Durch Ultrafiltration mittels Druck wurde die Hämoglobinkonzentration auf ca. 1 g% eingeengt und anschließend mit aqua dest. auf 640 mg% verdünnt.

Diese Hämolysate hatten eine Methämoglobinkonzentration von maximal 6 %.

Die auf die oben beschriebene Weise gewonnenen Hb-A- und Hb-F-Hämoglobinlösungen enthielten kein meßbares 2,3-DPG ($< 2 \cdot 10^{-6}$ M) (25).

1.2. 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG)

Benötigt wurde gereinigtes 2,3-DPG mit einem pH 6,8 und folgenden Molaritäten: 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M

Ausgangssubstanz war das Pentacyclohexylammoniumsalz des 2,3-DPG. Wegen ihres Einflusses auf den pH-Wert mußten die basischen Ammoniumgruppen des 2,3-DPG abgetrennt werden.

Vorgang: (8)

25 ml Dowex 50 W-X 8, 200 - 400 mesh, ionic-form H^{+7} werden sechsmal mit warmen aqua dest. gewaschen und anschließend in eine Säule gefüllt. Diese Säule wird mit 2,4 ml 0,1 M 2,3-DPG beschickt und mit 20,0 ml aqua dest. nachgewaschen.

Durch die Verdünnung ist das 2,3-DPG ungefähr 0,01 M.

Die genaue Molarität wird durch Titration eines Aliquots auf pH 10,0 mit 1 N, 1/10 N und 1/100 N NaOH ermittelt.

Durch Verdünnung mit aqua dest. wird in der Restmenge des gereinigten 2,3-DPG die angestrebte Molarität von 0,01 M erhalten.

Mit 1 N NaOH wird der pH-Wert von 6,8 eingestellt. Dabei werden für 17 ml 2,3-DPG ungefähr 520 μ l 1 N NaOH benötigt, die in der Molarität vernachlässigt werden.

Durch eine Verdünnungsreihe mit aqua dest. werden die Molaritäten von 10^{-3} M bis 10^{-4} M erhalten. Mit NaOH wird der pH-Wert jeweils auf 6,8 eingestellt. Die dadurch entstehenden Veränderungen der Molarität werden vernachlässigt.

1.3. Triäthanolamin-HCl-Puffer (TRAP)

Für die Versuche wurde ein TRAP-Puffer mit einer Ausgangsmolarität von 0,4 M, bzw. von 0,2 M und einem pH 6,8 verwendet.

1.4. Natriumnitrit (NaNO_2)

Als Oxidationsmittel wurde 0,02 M, bzw. 0,005 M NaNO_2 benützt, das aus einer Stammlösung (0,25 M NaNO_2 + 0,25 % Na_2CO_3) durch Verdünnung mit aqua dest. erhalten wurde. Die Stammlösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und nach einer Woche erneuert.

2. Methoden

2.1. Methode zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Die Hb-Konzentration wurde nach der Methode von Betke und Savelsberg bestimmt (5).

Reagenz:

Transformationslösung	KCN	200 mg
	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	200 mg
	Mit aqua dest. auf 1000 ml auffüllen	

Durchführung:

0,1 ml Hämolsat und 10 ml Transformationslösung werden durchmischt und 30 min stehengelassen.

Anschließend wird die Extinktion E der Lösung bei der Wellenlänge 540 nm, gegen aqua dest., ermittelt.

Die Berechnung der Hb-Konzentration erfolgt nach der Formel

$$E \times 0,14 = \text{Hb} \left[\frac{\text{g}}{\%} \right]$$

2.2. Methode zur Bestimmung der Methämoglobinkonzentration

2.2.1. Bestimmung der Methämoglobinkonzentration in Konservenblut

Der Gehalt an Methämoglobin in Konservenblut wurde nach der Methode von Evelyn und Malloy bestimmt (11).

Durchführung:

0,2 ml Citratblut werden mit 10 ml 0,9% NaCl-Lösung zweimal gewaschen. Die abzentrifugierten Erythrocyten werden mit 6 ml aqua dest. hämolysiert. Dieser Lösung werden 4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben.

Nach zehnminütiger Zentrifugation dieses Hämolsats bei 4000 U/min wird der Überstand abpipettiert und in zwei Reagenzgläser je 4 ml der klaren Lösung verteilt. (Glas a / Glas b)

Die anschließenden Messungen werden am Photometer durchgeführt. Die Wellenlänge, bei der gemessen wird, ist 630 nm. Es wird gegen aqua dest.

gemessen.

Es wird bestimmt:

b_1 : Extinktion des Hämolysats aus Glas b

b_2 : Extinktion des Hämolysats aus Glas b nach Zugabe von 1 Tropfen 5% KCN-Lösung

a_1 : Extinktion des Hämolysats aus Glas a nach Zugabe von 1 Tropfen 5% $K_3 [Fe(CN)_6]$ und zehnmündiger Reaktionszeit

a_2 : Extinktion des, mit $K_3 [Fe(CN)_6]$ oxidierten Hämolysats nach Zugabe von 1 Tropfen 5% KCN-Lösung

Der prozentuale Gehalt an Methämoglobin berechnet sich nach folgender Formel

$$\frac{b_1 - b_2}{a_1 - a_2} \times 100\% = \text{Met-Hb } \%$$

2.2.2. Bestimmung der Methämoglobinkonzentration in Hämoglobinlösungen

Durch die einzelnen Arbeitsschritte der Methode der Methämoglobinbestimmung nach Evelyn und Malloy (11) ergibt sich in den Meßküvetten eine Hämoglobinkonzentration, die ungefähr zwischen 200 mg% und 300 mg% liegt. Diese hat sich aus meßtechnischen Gründen als vorteilhaft erwiesen.

Um gleiche Voraussetzungen für die Methämoglobinbestimmung in Hämoglobinlösungen zu haben, wurden diese mit aqua dest. auf ca. 400 mg% verdünnt. Zu 6 ml dieser Lösung wurden 4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben, wodurch die gewünschte Hämoglobinkonzentration von ca. 240 mg% erhalten wurde.

Die folgenden Arbeitsschritte waren mit den oben beschriebenen identisch.

2.3. Meßmethode und Meßvorgang

Bei der Wellenlänge 578 nm kann die Abnahme von Oxyhämoglobin, was der Zunahme von Methämoglobin entspricht, photometrisch verfolgt werden.

Geräte:

Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Schreiber

Filter 578 nm

Thermostat 25°C, bzw. 37°C

2.3.1. Meßvorgang bei den Versuchen in Luftatmosphäre

Die Küvetten mit 1 ml Hb-A-, bzw. Hb-F-Lösung ohne, bzw. mit den entsprechenden Konzentrationen an 2,3-DPG, wurden mittels eines Thermostaten auf der konstanten Temperatur von 25°C, bzw. von 37°C gehalten.

Nach kurzem Vorlauf wurde die Reaktion gestartet. Dies geschah durch Zugabe von 50 µl 0,005 M, bzw. 0,02 M NaNO₂-Lösung, die durch rasches Umrühren gleichmäßig im Versuchsansatz verteilt wurde.

Mit Hilfe des Schreibers wurde der Ablauf der Reaktion verfolgt.

2.3.2. Meßvorgang bei den Begasungsversuchen

1 ml der Lösung von Hb-A und Hb-F, die jeweils kein, bzw. 5 mM 2,3-DPG enthielten, wurden in einer abgeschlossenen Küvette mittels eines Thermostaten auf der konstanten Temperatur von 25°C, bzw. von 37°C gehalten.

In dem abgeschlossenen System wurden die obigen Lösungen 15 Minuten lang mit Gasen bestimmter Sauerstoffkonzentration durchperlt und während des weiteren Versuchs von der Oberfläche begast. 0,02 M NaNO₂-Lösung wurden bei 25°C, bzw. bei 37°C mit dem jeweiligen Gas equilibriert und 50 µl zum Starten der Reaktion anaerob in die Versuchsküvette eingebracht.

Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen denen der Versuche bei Luftatmosphäre.

Der Reaktionsablauf wurde mittels Schreiber registriert.

2.3.3. Meßvorgang bei den Spontanoxidationsversuchen

Die Küvetten mit 1 ml Hb-A, bzw. Hb-F-Lösung wurden mit Hilfe eines Thermostats auf einer konstanten Temperatur von 25°C, bzw. von 37°C gehalten.

Wie bei den oben beschriebenen Versuchen wurde die Methämoglobinbildung als Abnahme der optischen Dichte bei 578 nm gemessen und mit Hilfe eines Schreibers registriert.

Die Oxidation erfolgte durch Stehenlassen an der Luft.

Bei der langen Versuchsdauer waren Photometerschwankungen nicht auszuschließen. Um diese korrigieren zu können, wurden, parallel zum Versuch,

Kontrollexperimente durchgeführt.

Nach 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden wurden entsprechende Proben durch Kaliumferricyanid, von zwanzigfacher Molarität des Hämoglobins, zu 100% Methämoglobin oxidiert.

Um auszuschließen, daß der Effekt des 2,3-DPG auf die Oxidationskinetik ein unspezifischer Einfluß ist, der durch die höhere Ionenstärke in den Lösungen mit 2,3-DPG bedingt wird, wurden Kontrollversuche mit Kaliumchlorid durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden den 2,3-DPG-freien Lösungen 35 mM KCl zugesetzt, deren Ionenstärke $\mu = 0,035$ der von 5 mM 2,3-DPG entspricht.

3. Durchführung der Versuche

3.1. Arbeitsschritte, die zu den angestrebten Küvettenkonzentrationen führen

Angestrebte Konzentrationen in den Küvetten:

2, 3-DPG	0 M	$5 \cdot 10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M
Hb ⁺)	160 mg%	160 mg%	160 mg%	160 mg%
TRAP	0,1 M	0,1 M	0,1 M	0,1 M
NaNO ₂ ⁺⁺⁾	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM	1,0 mM

⁺) 160 mg% Hb $\hat{=}$ $0,1 \text{ mM} \frac{\text{Hb}}{4}$; d.h. Nitrit : Häm = 10 : 1 (M/M)

⁺⁺⁾ Für die Versuche mit einem Verhältnis Nitrit : Häm = 4 : 1 war NaNO₂ in den Küvetten 0,4 mM.

3.1.1. Vorgehen bei Hb-A

Ausgangssubstanzen:

Hämolysat	Hb 640 mg%
TRAP	0,4 M, pH 6,8
2, 3-DPG	10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M
NaNO ₂	0,005 M, bzw. 0,02 M

Arbeitsschritte:

Das Hämolysat Hb = 640 mg% und der TRAP-Puffer 0,4 M, pH 6,8 wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Die dadurch entstandene Lösung A hatte ein Hb = 320 mg% und eine Pufferkonzentration TRAP 0,2 M. Die Lösung A wurde in sechs gleich große Teilmengen aufgeteilt. Zu jeder dieser Teilmengen wurde jeweils eine der folgenden Lösungen B im Verhältnis 1 : 1 gegeben. Dadurch erhielt man Lösung C.

Lösung A	Lösung B	Lösung C			
		Hb	TRAP	2,3-DPG	Lsg-Nr.
Lösung A + aqua dest.		160 mg%	0,1 M	0 M	C ₁
Lösung A + 10 ⁻² M 2,3-DPG		160 mg%	0,1 M	5 · 10 ⁻³ M	C ₂
Lösung A + 10 ⁻³ M 2,3-DPG		160 mg%	0,1 M	5 · 10 ⁻⁴ M	C ₃
Lösung A + 10 ⁻⁴ M 2,3-DPG		160 mg%	0,1 M	5 · 10 ⁻⁵ M	C ₄

Von den Lösungen C₁ bis C₄ wurden jeweils 1 ml in eine Meßküvette pipetiert.

Das für den Oxidationsvorgang angestrebte Verhältnis von Nitrit : Häm = 10 : 1 erhielt man dadurch, daß zu 1 ml der Lösungen C₁ bis C₄ 50 µl 0,02 M NaNO₂-Lösung gegeben wurden.

Für den Versuch mit dem Verhältnis Nitrit : Häm = 4 : 1 wurde die Reaktion mit 50 µl 0,005 M NaNO₂-Lösung gestartet.

3.1.2. Vorgehen bei Hb-F

Bezüglich der pH-Konstanz der verschiedenen Reaktionsansätze untereinander erwies sich folgendes Vorgehen als vorteilhaft. Die Verdünnungsreihe der 2,3-DPG wurde nicht mit aqua dest., sondern mit 0,1 M TRAP pH 6,8 durchgeführt.

Ausgangssubstanzen:

Hämolysat	Hb 640 mg%
TRAP	0,2 M, pH 6,8
2,3-DPG	10 ⁻² M, 10 ⁻³ M, 10 ⁻⁴ M in 0,1 M TRAP pH 6,8 gelöst
NaNO ₂	0,02 M

Das weitere Vorgehen ist mit dem, für Hb-A beschrieben, identisch.

Bei den Hb-F-Lösungen mit verdoppelter Pufferkonzentration (Küvettenkonzentration TRAP 0,2 M) betrug die Molarität des Ausgangspuffers

0,4 M, pH 6,8; die 2,3-DPG-Lösungen enthielten 0,2 M TRAP pH 6,8.

3.1.3. Anmerkung

Nur bei der Natriumnitritoxidation von Hb-A und Hb-F bei 25°C und Luftatmosphäre wurden alle Lösungen, von C₁ bis C₄, verwendet.

In den restlichen Versuchen wurde nur mit Lösung C₁ und C₂ gearbeitet.

3.2. Versuchsdurchführung und Auswertung der Versuche

3.2.1. Versuchsdurchführung

- Herstellung des entsprechenden Hämolyats
- Methämoglobinbestimmung im Hämolyat
- Herstellung der Lösungen wie unter 3.1.1. und 3.1.2. beschrieben
- pH-Messung in den Lösungen mittels Glaselektrode
- Kontrolle des Hämoglobingehalts der Lösungen
- Einpipettieren von 1 ml der Lösungen in die Meßküvetten
- Messung wie unter 2.3.1., 2.3.2. und 2.3.3. beschrieben.

3.2.2. Auswertung der Versuche

Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde t/2 verwendet. Das ist die Zeit, nach der das Hämoglobin zu 50% in Methämoglobin umgewandelt ist.

Um den Kurvenverlauf besser charakterisieren zu können, wurde die Kurvensteigung im Zeitpunkt t/2 gemessen und als Zunahme von Methämoglobin in Prozent pro Minute ausgedrückt.

$$S = \frac{\% \text{ Met-Hb}}{\text{min}}$$

Außerdem wurden bei den Spontanoxidationsversuchen die O₂-Hämoglobinkonzentration und die Zeit in einem halblogarithmischen Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen.

Die O₂-Hämoglobinkonzentration auf der logarithmischen Achse, die Zeit auf der linearen Achse.

Die Geschwindigkeitskonstanten k' und k'' [h⁻¹] wurden graphisch aus einem halblogarithmischen Diagramm ermittelt, bei dem die O₂-Hämo-

globinkonzentration auf der logarithmischen Achse und die Zeit auf der linearen Achse aufgetragen waren.

III. Resultate

1. NaNO_2 -Oxidation von Hämoglobinen

1.1. NaNO_2 -Oxidation von Hämoglobinen bei 25° C und Luftatmosphäre

1.1.1. NaNO_2 -Oxidation von adultem Hämoglobin (Hb-A) bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre (Abb. 1)

1.1.1.1. NaNO_2 -Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre

Tabelle 1a

pH 6,735 $\pm$ 0,015

2,3-DPG	t/2 $\pm$ S.D.	n	S
O M	59,9 $\pm$ 7,4	5	228
$5 \cdot 10^{-5}$ M	61,4 $\pm$ 4,96	5	238
$5 \cdot 10^{-4}$ M	73,7 $\pm$ 6,2	5	215
$5 \cdot 10^{-3}$ M	98,4 $\pm$ 10,1	5	158
sec			%Hb ⁺⁺⁺ min

Die Oxidationskinetik ist durch einen S-förmigen Verlauf gekennzeichnet.

Der Reaktionsablauf wird mit steigender 2,3-DPG-Konzentration verlangsamt, ohne daß dadurch der S-förmige Kurvenverlauf der Reaktion verloren ginge.

Die Probe mit 5 mM 2,3-DPG läuft um den Faktor 0,61 langsamer als die 2,3-DPG-freie Probe.

1.1.1.2. NaNO₂-Oxidation von chromatographierten Hb-A-Lösungen bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre

Tabelle 1b

pH 6,78 ± 0,01

2,3-DPG	t/2 ± S.D.	n	S
O M	53,2 ± 2,1	5	217
5 · 10 ⁻⁵ M	52,2 ± 2,2	5	206
5 · 10 ⁻⁴ M	55,8 ± 2,99	5	188
5 · 10 ⁻³ M	71,7 ± 2,6	5	138
	sec		% Hb ⁺⁺⁺ min

Die Oxidationskinetik ist S-förmig.

Durch steigende 2,3-DPG-Konzentration kommt es zu einer Verlangsamung der Reaktion. Dabei bleibt der S-förmige Kurvenverlauf erhalten. Zugabe von 5 mM 2,3-DPG führt zu einer Verlangsamung der Reaktion um den Faktor 0,74.

1.1.1.3. Vergleich der NaNO₂-Oxidation von chromatographierten und dialysierten Hb-A-Lösungen bei 25° C, mit steigender 2,3-DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre

Tabelle 1c

Hemmender Einfluß von 5 mM 2,3-DPG auf chromatographierte dialysierte Hämoglobinlösungen

	dialysiert	chromatographiert
2,3-DPG	t/2	t/2
O M	59,9	53,2
5 · 10 ⁻³ M	98,4	71,7
Faktor	0,61	0,74
	sec	sec

- Es fand sich, daß die NaNO₂-Oxidation von chromatographierten Hb-A-Lösungen schneller erfolgt, als bei dialysierten Hb-A-Hämolysaten (Tab. 1a und Tab. 1b).

Außerdem scheint durch die Chromatographie der Hb-A-Lösungen der hemmende Effekt, den 2,3-DPG auf die NaNO_2 -Oxidation von Hb-A-Hämolsate ausübt, geringer zu werden (Tab. 1c).

In beiden Versuchsreihen wurde durch Zugabe von 2,3-DPG die Reaktion verlangsamt, ohne daß dadurch der S-förmige Reaktionsablauf verloren ging.

1.1.2. NaNO_2 -Oxidation von chromatographisch isoliertem Hb-F bei 25°C , mit steigender 2,3-DPG-Konzentration, in Luftatmosphäre (Abb. 3)

Tabelle 2

$\text{pH } 6,865 \pm 0,005$

2,3-DPG	$t/2 \pm \text{S.D.}$	n	S
O M	47,6 $\pm$ 5,4	5	129
$5 \cdot 10^{-5}$ M	53,5 $\pm$ 2,9	5	114
$5 \cdot 10^{-4}$ M	57,9 $\pm$ 9,5	5	103
$5 \cdot 10^{-3}$ M	58,5 $\pm$ 2,8	5	88
	sec		% Hb ⁺⁺⁺ min

Die Oxidationskinetik ist S-förmig.

Mit steigender Konzentration des 2,3-DPG im Reaktionsansatz kommt es zu einer zunehmenden Verlangsamung der Reaktion. Dabei bleibt der S-förmige Kurvenverlauf erhalten.

1.1.3. Vergleich der NaNO_2 -Oxidation von chromatographierten Hb-A- und Hb-F-Lösungen bei 25°C , ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre

Wegen der Unterschiedlichkeit der pH-Werte der Hb-A- und Hb-F-Lösungen und der bekannten pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (J. und III. 1. 7.) ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich.

Die NaNO_2 -Oxidation von Hb-F erfolgt jedoch sicher rascher als die von Hb-A.

Vergleicht man den hemmenden Einfluß, den 5 mM 2,3-DPG auf die Reaktion ausüben, so findet man, daß dieser Effekt in den Hb-A- und Hb-F-Lösungen gleich groß ist.

1.2. NaNO₂-Oxidation von Hämoglobinen bei 37° C und Luftatmosphäre

1.2.1. NaNO₂-Oxidation von dialysiertem Hb-A bei 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre (Abb. 4)

Tabelle 3

pH 6,7 $\pm$ 0,03

2,3-DPG	$\bar{t}/2 \pm$ S.D.	n	S
0 M	34,3 $\pm$ 3,3	6	259
5 · 10 ⁻³ M	336,8 $\pm$ 14,4	4	6,3
	sec		% Hb ⁺⁺⁺ min

Die Erhöhung der Temperatur auf 37°C beschleunigt die Reaktion der 2,3-DPG-freien Probe. Sie läuft um den Faktor 1,7 schneller als bei 25°C.

Bei der Probe mit 5 mM 2,3-DPG führt die Temperaturerhöhung zu einer Verlangsamung um den Faktor 0,27 gegenüber der Reaktion bei 25°C.

Wie bei den Versuchen bei 25°C wird die Oxidation durch Zugabe von 2,3-DPG verlangsamt.

Bei 37°C verliert die Reaktion außerdem ihren S-förmigen Kurvenverlauf.

5 mM 2,3-DPG führen bei 25°C zu einer Verlangsamung der Reaktion um den Faktor 0,6, bei 37°C um den Faktor 0,1; d.h. die Temperaturerhöhung verstärkt den hemmenden Einfluß von 5 mM 2,3-DPG 0,6fach.

1.2.2. NaNO₂-Oxidation von Hb-F bei 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre (Abb. 4)

Durch die Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C wird die Methämoglobinbildung in der 2,3-DPG-freien Probe um den Faktor 1,05 beschleunigt.

In der Probe mit 5 mM 2,3-DPG führt die Temperaturerhöhung zu einer Verlangsamung der Reaktion um den Faktor 0,72. Außerdem verliert die Oxidationskinetik ihren autokatalytischen Charakter.

Die Zugabe von 5 mM 2,3-DPG führt wie bei 25°C zur Reaktionsverlangsamung und zwar bei 25°C um den Faktor 0,8, bei 37°C um den Faktor 0,5.

Somit wird der hemmende Effekt von 5 mM 2,3-DPG durch die Temperaturerhöhung um den Faktor 1,6 verstärkt.

Tabelle 4

pH 6,86

2,3-DPG	$\overline{t/2} \pm \text{S.D.}$	n	S
0 M	45,2 $\pm$ 2,9	4	172
5 $\cdot$ 10 ⁻³ M	86,1 $\pm$ 6,7	4	32
sec		% Hb ⁺⁺⁺ min	

1.3. NaNO₂-Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten in Sauerstoffatmosphäre (pO₂ = 700 Torr), bei 25° C und 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG (Abb. 5)

Tabelle 5

25° C			
2,3-DPG	$\overline{t/2} \pm \text{S.D. (sec)}$	n	S
0 M	27,2 $\pm$ 2,9	8	193
5 · 10 ⁻³ M	41,7 $\pm$ 2,5	4	158
37° C			% Hb ⁺⁺⁺ min
2,3-DPG	$\overline{t/2} \pm \text{S.D. (sec.)}$	n	S
0 M	20,8 $\pm$ 2,2	9	273
5 · 10 ⁻³ M	38,5 $\pm$ 3,4	4	163

Die Reaktion verläuft für alle Proben S-förmig.

Die Temperaturerhöhung von 25° C auf 37° C bewirkt in der 2,3-DPG-freien Probe eine Beschleunigung der Reaktion um den Faktor 1,31.

Bei den Versuchen mit 5 mM 2,3-DPG kommt es durch Temperaturerhöhung zu einer Beschleunigung des Oxidationsvorganges um den Faktor 1,08.

5 mM 2,3-DPG bedingen bei 25° C und bei 37° C eine Reaktionsverlangsamung. Bei 25° C um den Faktor 0,65 bei 37° C um den Faktor 0,54. Daraus ergibt sich, daß die Temperaturerhöhung den hemmenden Effekt von 5 mM 2,3-DPG 1,2 mal verstärkt.

1.4. Vergleich der NaNO₂-Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten in Luft- und Sauerstoffatmosphäre, bei 25° C und 37° C, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG

Die Oxidation läuft bei einem Sauerstoffpartialdruck pO₂ = 700 torr schneller ab als bei pO₂ = 140 torr. In der 2,3-DPG-freien Probe bei 25° C um den Faktor 1,6, bei 37° C um den Faktor 1,65, in der Probe mit 5 mM 2,3-DPG bei 25° C um den Faktor 2,2, bei 37° C um den Faktor 8,7 (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6

	ohne 2, 3-DPG			mit 5 mM 2, 3-DPG		
	140 torr	700 torr	F	140 torr	700 torr	F
25°C	43,1	27,2	1,6	91,6	41,7	2,2
37°C	34,3	20,8	1,65	336,8	38,5	8,7
	$\bar{t}/2$ (sec)			$\bar{t}/2$ (sec)		

Eine Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C bewirkt bei den Versuchen mit 5 mM 2, 3-DPG in Sauerstoffatmosphäre, im Gegensatz zu denen in Luftatmosphäre, eine Reaktionsbeschleunigung.

Durch Temperaturerhöhung wird der hemmende Einfluß des 2, 3-DPG verstärkt. Dieser Effekt ist in Sauerstoffatmosphäre um den Faktor 0,26 kleiner als in Luftatmosphäre.

1.5. NaNO₂-Oxidation von dialysierten Hb-A-Hämolysaten bei 25°C, mit und ohne 5 mM 2, 3-DPG, in Luftatmosphäre, Verhältnis Nitrit: Häm = 4 : 1 (Abb. 7)

Eine Änderung des Verhältnisses Nitrit : Häm von 10 : 1 auf 4 : 1 bewirkt, daß die Oxidation, sowohl die von Hb-A-Hämolysaten ohne 5 mM 2, 3-DPG, als auch die mit 5 mM 2, 3-DPG, ungefähr sechzig mal langsamer abläuft.

Bei den Hämolysaten mit 2, 3-DPG verliert sich der sonst für die NaNO₂-Oxidation typische S-förmige Kurvenverlauf; d.h. die Reaktion läuft nicht mehr autokatalytisch ab.

Auffällig ist, daß bis zu einem Methämoglobingehalt von ca. 25%, in der Probe mit 5 mM 2, 3-DPG die Umwandlung von Hämoglobin in Methämoglobin rascher erfolgt als in dem 2, 3-DPG-freien Hämolysat.

Tabelle 7 Verhältnis Nitrit : Häm = 4 : 1

2, 3-DPG	$\bar{t}/2 \pm$ S.D. (sec)	n	S
0 M	3910 $\pm$ 357,4	5	1,74
5 · 10 ⁻³ M	5480 $\pm$ 171,5	6	0,45
% Hb ⁺⁺⁺ min			

1.6. pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der NaNO_2 -
Oxidation von Hb-F (Abb. 8)

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hb-A vom pH-Wert ist bekannt (4).

Um eine Vorstellung vom Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hb-F zu bekommen, wurden durch Titration mit 1 N NaOH, bzw. 1 N HCl-Lösung, in sonst identischen Hämolsaten, verschiedene pH-Werte eingestellt. Der hierfür gewählte pH-Bereich entspricht den pH-Werten, die in den, zur NaNO_2 -Oxidation hergestellten, Hb-F-Hämolsaten gemessen wurden.

Dabei ergab sich in einem pH-Bereich von 6,7 bis 6,95 ein weitgehend lineares Verhältnis von pH-Wert zu Halbwertszeit.

Im gewählten Bereich läßt sich die gefundene Beziehung mit folgender Formel beschreiben:

$$t/2_{\text{pH}} = 205 (\text{pH} - 6,6) \text{ [sec]}$$

Anfangs traten bei Hb-F in den einzelnen Reaktionsansätzen pH-Unterschiede auf. Um die gemessenen Halbwertszeiten besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie auf pH 6,8 umgerechnet.

Das geschah nach folgender Formel, die sich aus der obigen ableitet:

$$t/2_{6,8} = \frac{t/2 \cdot 0,2}{(\text{pH} - 6,6)} \text{ [sec]}$$

$t/2_{6,8}$: auf pH 6,8 umgerechnete Halbwertszeit

$t/2$: die gemessene Halbwertszeit der Reaktion

pH : pH-Wert, bei dem die Reaktion ablief.

Die so ermittelten Werte dienten nur zur Orientierung. Sie wurden bei den vorliegenden Ergebnissen nicht berücksichtigt.

1.7. Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf die Reaktionsgeschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hb-F

Tabelle 8

	TRAP 0,1 M pH 6,865 $\pm$ 0,005		TRAP 0,2 M pH 6,83 $\pm$ 0,01	
2,3-DPG	$\bar{t}/2 \pm$ S.D.	n	$\bar{t}/2 \pm$ S.D.	n
0 M	47,6 $\pm$ 5,4	5	104 $\pm$ 16,5	4
$5 \cdot 10^{-7}$ M	51,8 $\pm$ 3,7	4	107 $\pm$ 17,1	4
$5 \cdot 10^{-6}$ M	53,3 $\pm$ 3,2	5	106,2 $\pm$ 21,3	4
$5 \cdot 10^{-5}$ M	53,5 $\pm$ 2,9	5	104,6 $\pm$ 18,2	4
$5 \cdot 10^{-4}$ M	57,9 $\pm$ 9,5	5	105,8 $\pm$ 18,6	4
$5 \cdot 10^{-3}$ M	58,5 $\pm$ 2,8	5	114,3 $\pm$ 17,3	4
	sec		sec	

Die Molarität des TRAP-Puffers im Reaktionsansatz wurde von 0,1 M auf 0,2 M erhöht.

Wegen der großen Streuung der Werte bei den Versuchen mit TRAP 0,2 M kann keine exakte Aussage gemacht werden.

Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß die Erhöhung der Molarität des TRAP-Puffers zu einer Verlangsamung der Reaktion führt. Sie bedingt jedoch sicher keine Reaktionsbeschleunigung. Das steht im Gegensatz zu NaNO_2 -Oxidationsversuchen mit Hb-A und Phosphatpuffer. Dort wurde eine Beschleunigung der Oxidation mit steigender Molarität des Phosphatpuffers gefunden (4).

1.8. pH-Konstanz im Reaktionsansatz bei den Hb-F-Lösungen

Tabelle 9 pH-Messung im Reaktionsansatz

Bei diesen Hämoglobinlösungen wurde die Verdünnungsreihe des 2,3-DPG mit aqua dest. durchgeführt. (vgl. II, 3.1.2.)

2,3-DPG	pH $\pm$ S.D.	n
0 M	6,89 $\pm$ 0,09	4
$5 \cdot 10^{-7}$ M	6,87 $\pm$ 0,11	4
$5 \cdot 10^{-6}$ M	6,88 $\pm$ 0,11	4
$5 \cdot 10^{-5}$ M	6,86 $\pm$ 0,11	4
$5 \cdot 10^{-4}$ M	6,86 $\pm$ 0,09	4
$5 \cdot 10^{-3}$ M	6,78 $\pm$ 0,09	4

Die gemessenen pH-Werte (vgl. Tabelle 9) und die Titrationskurve des 2,3-DPG (vgl. VII.) ließen an die Möglichkeit einer Pufferwirkung des 2,3-DPG denken.

Um auszuschließen, daß unterschiedliche pH-Veränderungen in den einzelnen Reaktionsansätzen während des Oxidationsvorganges zu einer Beeinflussung der Kinetik führen, wurden pH-Vergleichsmessungen vor und nach der Oxidation durchgeführt.

Tabelle 10

pH-Vergleichsmessungen vor und nach Oxidation

2,3-DPG	TRAP 0,1 M		TRAP 0,2 M	
	Vor Oxidation	Nach Oxidation	Vor Oxidation	Nach Oxidation
0 M	6,87	6,89	6,82	6,85
$5 \cdot 10^{-7}$ M	6,87	6,87	6,83	6,87
$5 \cdot 10^{-6}$ M	6,86	6,88	6,84	6,86
$5 \cdot 10^{-5}$ M	6,86	6,89	6,84	6,84
$5 \cdot 10^{-4}$ M	6,87	6,88	6,83	6,84
$5 \cdot 10^{-3}$ M	6,86	6,88	6,82	6,83

Dabei ergab sich, daß bezüglich der geringen pH-Veränderungen in den Lösungen, vor und nach Oxidation, zwischen den verschiedenen Reaktionsansätzen keine wesentlichen Unterschiede bestehen. Auch eine Verdoppelung der Puffermolarität änderte die Verhältnisse nicht.

2. Spontanoxidation von Hämoglobinen

2.1. Spontanoxidation von Hb-A- und Hb-F bei 37° C ohne und mit 5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre

Tabelle 11 Halbwertszeiten

Hb-A	pH 6,7 $\pm$ 0,3	
2,3-DPG	$\bar{t}/2 \pm$ S.D. (min)	n
0 M	1675 $\pm$ 147	4
$5 \cdot 10^{-3}$ M	175 $\pm$ 23	6
Hb-F	pH 6,7 $\pm$ 0,3	
0 M	562 $\pm$ 43	4
$5 \cdot 10^{-3}$ M	159 $\pm$ 2,2	4

Tabelle 12 Geschwindigkeitskonstanten der Spontanoxidation von
Hb-A- und Hb-F bei 37°C, in Luftatmosphäre

k' : Geschwindigkeitskonstante für den ersten Teil der Reaktion

k'' : Geschwindigkeitskonstante für den zweiten Teil der Reaktion

	$k' \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k'' \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Hb-A	0,10	0,45
Hb-A + 35 mM KCl	0,13	0,43
Hb-A + 5 mM 2,3-DPG	0,61	0,44
Hb-F	0,34	
Hb-F + 5 mM 2,3-DPG	0,66	0,32

Bei 37°C wird die Spontanoxidation von adultem Hämoglobin durch 5 mM 2,3-DPG ungefähr 10-fach beschleunigt, von fetalem Hämoglobin etwa 3,5-fach.

In den 2,3-DPG-freien Lösungen läuft die Reaktion bei fetalem Hämoglobin ca. 3 mal schneller ab als bei adultem.

Dagegen besitzen die Oxidationsgeschwindigkeiten von Hb-A- und Hb-F-Hämolysaten mit 5 mM 2,3-DPG die gleiche Größenordnung.

Die Oxidationskinetik der Proben mit 35 mM KCl unterscheidet sich sowohl bei Hb-A, als auch bei Hb-F nicht von denen

der 2,3-DPG-freien Lösungen. Somit ist die Beeinflussung der Oxidationskinetik durch 2,3-DPG ein spezifischer Effekt und nicht nur durch die höhere Ionenstärke dieser Lösungen bedingt.

Abb. 11 und Tabelle 12

Die Spontanoxidation von adultem, 2,3-DPG-freiem Hämoglobin ist eine biphasische Reaktion. Dabei ist die Geschwindigkeitskonstante k' für den Anfangsteil der Reaktion kleiner als jene k'' , die für die zweite Phase der Reaktion gilt.

Durch 5 mM 2,3-DPG wird k' ungefähr 6-fach vergrößert, während k'' nicht beeinflusst wird. Die Geschwindigkeitskonstante k' ist jetzt größer als k'' .

Bei 2,3-DPG-freiem, fetalen Hämoglobin findet man eine monophasische Reaktion. Im Gegensatz dazu läuft die Reaktion mit 5 mM 2,3-DPG biphasisch ab. Es findet sich dabei eine ca. 2-fach erhöhte Geschwindigkeitskonstante k' . Insgesamt ähnelt der Reaktionsablauf jenem von adultem Hämoglobin mit 5 mM 2,3-DPG.

2.2. Spontanoxidation von Hb-A bei 25°C, ohne und mit
5 mM 2,3-DPG, in Luftatmosphäre

Tabelle 13

pH 6,7 $\pm$ 0,03

2,3-DPG	$\bar{t}/2 \pm \text{S.D. (min)}$	n
0 M	3000	9
$5 \cdot 10^{-3}$ M	823 ± 110	9

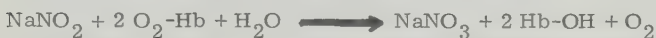
Die Reaktionsgeschwindigkeit der Proben wird durch Zugabe von 5 mM 2,3-DPG auf das Vierfache gesteigert.

Durch die Erniedrigung der Temperatur von 37°C auf 25°C wird die Reaktionsgeschwindigkeit in der 2,3-DPG-freien Probe ungefähr um den Faktor 0,5 in der Probe mit 5 mM 2,3-DPG um den Faktor 0,2 verlangsamt.

IV. Diskussion

1. Nitritoxidationsversuche

Der Reaktionsmechanismus der Nitritoxidation von Hämoglobinen ist bisher nur unvollständig aufgeklärt. Nach Greenberg (12) läßt sich die Reaktion mit folgender Formel beschreiben:



Es wird also nicht nur das Hämoglobin zu Methämoglobin, sondern auch das Nitrit zu Nitrat oxidiert.

Der Reaktionsablauf ist gekennzeichnet durch eine langsame initiale Phase (lag-phase) und eine, darauf folgende, rasche Phase der Methämoglobinbildung. Während der lag-phase akkumuliert in Gegenwart von Sauerstoff NO-Hb, gleichzeitig wird NO gebildet. Dabei ist in Gegenwart von Sauerstoff die gebildete Menge NO geringer, als in Abwesenheit von Sauerstoff. Da die Zugabe von NO zu Hämoglobin zu einer raschen Methämoglobinbildung führt, wird NO als die Schlüsselsubstanz angenommen, die zur Beschleunigung im Verlauf der Methämoglobinbildung führt. (Literatur bei (18))

Es ist bekannt (Literatur bei (18)), daß die Geschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hämoglobinen, gemessen an $t/2$, durch verschiedene Parameter beeinflusst wird. Sie hängt zum einen vom Hämoglobintyp ab. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, in Übereinstimmung mit Betke (3), daß fetales Hämoglobin rascher als adultes oxidiert wird.

Weiterhin wird die NaNO_2 -Oxidation durch fallenden pH-Wert, steigende Temperatur und steigende NaNO_2 -Konzentration beschleunigt. (4) Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies.

Andere im einzelnen noch ungeklärte Faktoren haben einen Einfluß auf $t/2$. (Reinheitsgrad des Hämoglobins, vgl. Tab. 1a und Tab. 2a)

Es ist bekannt, daß steigender Sauerstoffdruck die Nitritoxidation von Hämoglobinen beschleunigt (7), was auch aus unseren Ergebnissen hervorgeht (Tab. 6).

Offen ist die Frage nach dem Mechanismus über den die Sauerstoffkonzentration die Oxidationsgeschwindigkeit beeinflusst. Zu diskutieren sind grundsätzlich zwei Möglichkeiten: (a) die Sauerstoffkonzentration selbst ist der entscheidende Faktor, (b) die Zunahme von Hämoglobin in der Desoxyform (T-state) bei niedrigerem pO_2 bedingt die veränderte Reaktivität des Hämoglobins.

Die Verlangsamung der Reaktion durch 2,3-DPG würde für die zweite Möglichkeit (b) sprechen.

Ein allosterischer Effekt des 2,3-DPG auf das Hämoglobinmolekül begünstigt die Desoxyform, während der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) unverändert bleibt. Entsprechend ist der Reaktionsablauf der Nitritoxidation von Hämoglobinen bei einem pO_2 von 140 Torr in Gegenwart von 2,3-DPG (Abb. 1 und Abb. 3) verlangsamt, d. h. in Richtung des Reaktionsablaufs in Abwesenheit von Sauerstoff verschoben. (18) Gegen einen allosterischen Effekt des 2,3-DPG als Ursache der Verlangsamung spricht allerdings die Tatsache, daß eine Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C den hemmenden Effekt des 2,3-DPG deutlich verstärkt, die Assoziationskonstante von Hämoglobin (2) und Methämoglobin (14) für organische Phosphate jedoch abnimmt.

Als weitere Möglichkeit, unabhängig von einer Beeinflussung der Hämoglobininformation durch 2,3-DPG, wäre eine direkte Wechselwirkung von 2,3-DPG mit intermediär entstehendem NO zu diskutieren. (Jung, F. 1973: Diskussion zu (27))

Solange der Reaktionsmechanismus der Nitritoxidation von Hämoglobinen nicht vollständig aufgeklärt ist, müssen jedoch solche Interpretationsversuche zwangsläufig spekulativ bleiben.

Gegen die vorliegenden Untersuchungen ist der Einwand möglich, daß die Messungen bei nur einer Wellenlänge (578 nm) erfolgten. Dies bedeutet grundsätzlich, daß die Entstehung von Zwischenprodukten bei der Nitritoxidation, wie $Hb(2)NO_2$ und $Hb(3)NO$ neben der Entstehung von Methämoglobin zu den gemessenen Extinktionsänderungen beiträgt (17). In früheren Untersuchungen (Abb. 6) wurde jedoch bei 630 nm der gleiche Reaktionsablauf gemessen, wie wir ihn bei 578 nm finden (Abb. 1).

Weiter spricht gegen eine Verfälschung der Befunde unter den gewählten Versuchsbedingungen durch $Hb(2)NO_2$ und $Hb(3)NO$, daß die Reaktion mit und ohne 2,3-DPG bei der gleichen Endextinktion zum Stillstand kommt.

Zugabe von 2,3-DPG beeinflusst also zumindest nicht das Verhältnis von Methämoglobin zu möglichen $Hb(3)$ -Stickstoff-Verbindungen, die bei 578 nm spektral interferieren, nach Ablauf der Reaktion.

Wieweit allerdings während der Oxidation entstehende Intermediate in die, bei 578 nm gemessene Oxidationskinetik eingehen, muß offen bleiben, und damit die Frage nach dem Mechanismus, über den 2,3-DPG diese Oxidationskinetik beeinflusst.

Dies gilt insbesondere für die Beobachtung, daß bei 25° C 2,3-DPG die Nitritoxidation stark verlangsamt, ohne den S-förmigen Reaktionsablauf zu beeinflussen (Abb. 1 und Abb. 3), während bei 37° C in Gegenwart von 2,3-DPG die verlangsamte Reaktion nicht mehr diesen S-förmigen Verlauf zeigt (Abb. 4). Ein Phänomen, das bei hohen Sauerstoffdrücken (pO_2 : 700 Torr) nicht beobachtet wird. Betrachtet man die Resultate aus pathophysiologischer Sicht, so könnte von Bedeutung sein, daß 5 mM 2,3-DPG die Methämoglobinbildung durch Nitrit bei 37° C um den Faktor 10 verlangsamt. Denn bei toxischen, durch Nitrit verursachten Methämoglobinämien könnte der Einfluß des 2,3-DPG auf die Methämoglobinbildungsrate durchaus in einer Größenordnung sein, die Auswirkungen auf die Methämoglobinkonzentration in den Erythrozyten hat.

2. Spontanoxidationsversuche

Brooks beschreibt eine Abhängigkeit der Oxidationsgeschwindigkeit von Hämoglobin von der Konzentration des desoxygenierten Hb-Radikals, dem Sauerstoffpartialdruck und dem inhibierenden Effekt des Sauerstoffs, wobei Sauerstoffpartialdrucke größer $pO_2 = 20$ mm Hg eine zunehmende Geschwindigkeitsverringern der Methämoglobinbildung bedingen. (6)

Durch 2,3-DPG wird die Geschwindigkeit der Spontanoxidation von Hb-A und in geringerem Maße auch die von Hb-F erhöht.

Diese Beschleunigung ist ungefähr zweimal größer, als die, unter vergleichbaren Bedingungen, bei der Kaliumferricyanidoxidation von Hämoglobin beobachtete. (31)

Bei vollständig mit Sauerstoff gesättigtem Hämoglobin dürfte dieser Effekt des 2,3-DPG nicht durch Konformationsänderung bedingt sein, d. h. durch Änderung der O_2 -Sättigung des Hämoglobins.

Es ist bekannt, daß der spin-state des Zentralatoms Eisen, und damit dessen Reaktionen, durch Liganden beeinflußt wird. (9) Bei Desoxyhämoglobin befindet sich das Häm-Eisen im high-spin-Zustand, bei Oxyhämoglobin im low-spin-Zustand.

Man fand, daß 2,3-DPG den high-spin-state des Hämeisens des Oxyhämoglobins begünstigt. (24) Das hieße, daß der Effekt des 2,3-DPG auf das Häm dem auf die Proteinkonfiguration des Hämoglobins vorausginge und wäre eine Erklärung des Befundes, daß 2,3-DPG die Oxidationsgeschwindigkeit luftgesättigten Hämoglobins beschleunigt.

Die Oxidation von Hämoglobin hinge damit eher vom spin-state des Häm-Eisens, als vom Ausmaß der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins ab. Allerdings wäre zu diskutieren, daß auch bei einem pO_2 von 140 Torr ein geringer Anteil des Hämoglobins als Desoxyhämoglobin vorliegt, das zu Methämoglobin oxidiert. In Gegenwart von 2,3-DPG wäre dieser Anteil vermehrt, die Oxidation begünstigt. Neueste Untersuchungen (28) an Hämoglobinen in reiner Sauerstoff- bzw. CO-Atmosphäre sprechen jedoch gegen diese Deutung.

Die biphasische Kinetik der Hb-A-Spontanoxidation ist charakterisiert durch eine niedrige Geschwindigkeitskonstante k' zu Beginn der Reaktion, auf die eine größere Geschwindigkeitskonstante k'' folgt. (III. 2. 1.)

Zugabe von 2,3-DPG führt zu einer sechsfachen Erhöhung der Geschwin-

digkeitskonstante k' , die dann größer als k'' ist. Die dadurch erhaltene biphasische Reaktionskinetik ähnelt der, die für die Hb-A-Spontanoxidation bei einem zwanzigfachen molaren Überschuß von anorganischem Phosphat beschrieben wurde. (21)

Die Kinetik der Hb-F-Spontanoxidation ist monophasisch. Wie bei Hb-A bedingt die Zugabe von 2,3-DPG eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante k' . Sie wird um den Faktor 2 größer. Dadurch entsteht eine biphasische Reaktionskinetik, ähnlich der der Hb-A-Spontanoxidation mit 2,3-DPG. (III. 2. 1.)

Sowohl bei Hb-A, als auch bei Hb-F wird also die initiale Phase der Reaktion beschleunigt.

Bei der Spontanoxidation von Hb-A wird ein unterschiedliches Verhalten der α - und der β -Ketten beschrieben; die α -Ketten werden schneller oxidiert als die β -Ketten. (21) Dieser schnellen α -Kettenoxidation entspricht eine schnelle initiale Phase des Reaktionsablaufs. (21)

Geht man in Anlehnung an Mansouri und Winterhalter (21) und Olson und Gibson (23) davon aus, daß die unterschiedlichen Phasen der Reaktionskinetik die Reaktionsweise der verschiedenen Hämoglobinketten reflektieren, dann müßte man einen Einfluß auf die β (γ)-Ketten, d.h. die zweite Phase der Reaktion erwarten. Es ist nämlich bekannt, daß nur die nicht α -Ketten an der Bindung von 2,3-DPG beteiligt sind. (7) Zudem gibt es Untersuchungen über die Wechselwirkung von 2,3-DPG mit künstlichen Hämoglobin-Methämoglobinhybriden, bei denen die Wertigkeit des Hämeisens der α - und β -Ketten unterschiedlich ist, $(\alpha^{\text{III}}\text{CN } \beta^{\text{II}})_2$ und $(\alpha^{\text{II}} \beta^{\text{III}}\text{CN})_2$. Dabei fand man, daß bei pH 7 der 2,3-DPG-Effekt auf die Sauerstoffaffinität (20), und auf das Maß der Bindung des 2,3-DPG (1) bei den $(\alpha^{\text{III}}\text{CN } \beta^{\text{II}})_2$ -Hybriden um den Faktor 3 größer ist als bei den $(\alpha^{\text{II}} \beta^{\text{III}}\text{CN})_2$ -Hybriden. Das heißt, daß für einen 2,3-DPG-Effekt auf das Hämoglobinmolekül native β^{II} -Ketten Voraussetzung sind.

Die vorliegenden Ergebnisse, bei denen sich ein Effekt des 2,3-DPG vorwiegend auf die erste Phase der Reaktionskinetik der Hb-A- und der Hb-F-Spontanoxidation zeigt, die nach Mansouri und Winterhalter (21) den α -Ketten entspricht, sind in dem Zusammenhang schwer zu deuten und lassen diese Art der Interpretation der Reaktionskinetiken zweifelhaft erscheinen.

Nach neuesten Befunden (22, 23) wird allerdings diskutiert, daß die Bindung von 2,3-DPG zwar an den β -Ketten erfolgt, daß in der Folge jedoch die O_2 -Affinität speziell der α -Ketten vermindert wird. In dieses Konzept würde sich die beschriebene Erhöhung der initialen Geschwindigkeitskonstante durch 2,3-DPG sinnvoll einfügen; es wäre dann nämlich ein Einfluß von 2,3-DPG auf die initiale Phase, d. h. die Phase, die der Oxidation der α -Ketten entspricht, zu erwarten. Auf die Methämoglobinkonzentration in normalen Erythrozyten dürfte die beobachtete Beschleunigung der Spontanoxidation von Hämoglobin durch 2,3-DPG keinen Einfluß haben, da dort die Kapazität der Methämoglobinreduktase die der methämoglobinbildenden Systeme um den Faktor 250 übertrifft. (13)

Im Falle eines hereditären Methämoglobinreduktasemangels muß man jedoch mit einer 2,3-DPG-abhängigen, erhöhten Methämoglobinbildung rechnen, da die Leistungsfähigkeit des reduzierenden Systems erniedrigt ist, und die Methämoglobinämie eine Hypoxie bedingt, die zu einem Anstieg der 2,3-DPG-Konzentration im Erythrozyten führt. (26)

V. Zusammenfassung

1. Einfluß des 2,3-DPG auf die Nitritoxidation von Hämoglobin

Bei einem Sauerstoffpartialdruck von 140 torr wird die Nitritoxidation von adultem und in geringerem Maße von fetalem Hämoglobin durch 2,3-DPG gehemmt. Dieser Effekt wird durch steigende Temperatur (von 25°C auf 37°C) merklich verstärkt, wobei die Reaktion, bei Hb-A und Hb-F, ihren autokatalytischen Charakter verliert.

Bei einer Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes auf 700 torr bewirkt 2,3-DPG eine geringere, aber immer noch signifikante Hemmung der Nitritoxidation von Hb-A; der autokatalytische Charakter bleibt erhalten.

2. Einfluß von 2,3-DPG auf die Spontanoxidation von Hämoglobin

Die Spontanoxidation von Hb-A, bei 37°C, ist ohne und mit 2,3-DPG eine biphasische Reaktion. Im Gegensatz dazu verläuft bei 37°C die Spontanoxidation von Hb-F ohne 2,3-DPG monophasisch; sie wird durch Zugabe von 2,3-DPG biphasisch.

2,3-DPG beschleunigt bei Hb-A und Hb-F die Anfangsphase der Reaktion.

Durch 2,3-DPG wird die Spontanoxidation von adultem Hämoglobin, bei 37°C, um den Faktor 10, von fetalem Hämoglobin um den Faktor 3,5 beschleunigt.

Ohne 2,3-DPG wird fetales Hämoglobin etwa dreimal schneller oxidiert als adultes. Der Unterschied scheint durch eine niedrigere Geschwindigkeitskonstante k' für den Anfangsteil der Hb-A-Oxidation bedingt zu sein.

Mit 2,3-DPG haben die Reaktionsgeschwindigkeiten von Hb-A und Hb-F die gleiche Größenordnung.

Es wird vermutet, daß der Einfluß des 2,3-DPG auf die Oxidationskinetik über eine Beeinflussung des spin-states des Hämeisens erfolgt.

VI. Literaturverzeichnis

1. Bauer, C., Henry, Y., Banerjee, R.: Binding of 2,3-diphosphoglycerate to haemoglobin valency hybrids. *Nature* 242 (1973), 208.
2. Benesch, R.E., Benesch, R., Yu, C.I.: The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic-strength, and hemoglobinconcentration. *Biochemistry* 8 (1969), 2567.
3. Betke, K.: Vergleichende Untersuchung der Oxydation von fetalem und Erwachsenen-Oxyhämoglobin durch Natriumnitrit. *Die Naturwissenschaften* 2 (1953), 60.
4. Betke, K., Greinacher, I., Titze, O.: Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Natriumnitrit. *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 229 (1956), 220.
5. Betke, K., Savelsberg, W.: Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin. *Biochem. Z.* 320 (1950), 431.
6. Brooks, J.: The oxidation of haemoglobins to methaemoglobins by oxygen. II. The relation between the rate of oxidation and the partial pressure of oxygen. *Proc. roy. Soc. B.* 118 (1935), 560.
7. Brooks, J.: The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen. *Proc.roy.Soc.B.* 123 (1937), 368.
8. Bunn, H.F., Briehl, R.W.: The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J.clin. invest.* 49 (1970), 1088.
9. Christen, H.R.: Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie. Verlag Sauerländer Aarau, Salle Verlag Frkft/Main 1971.
10. Dozy, A.M., Kleihauer, E.F., and Huisman, T.H.J.: Studies on the heterogenity of hemoglobin. Chromatography of various human and animal hemoglobin types on DEAE-Sephadex. *J.Chromatogr.* 32 (1968) 723.
11. Evelyn, K.A., Malloy, H.T.: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 126 (1938), 655.

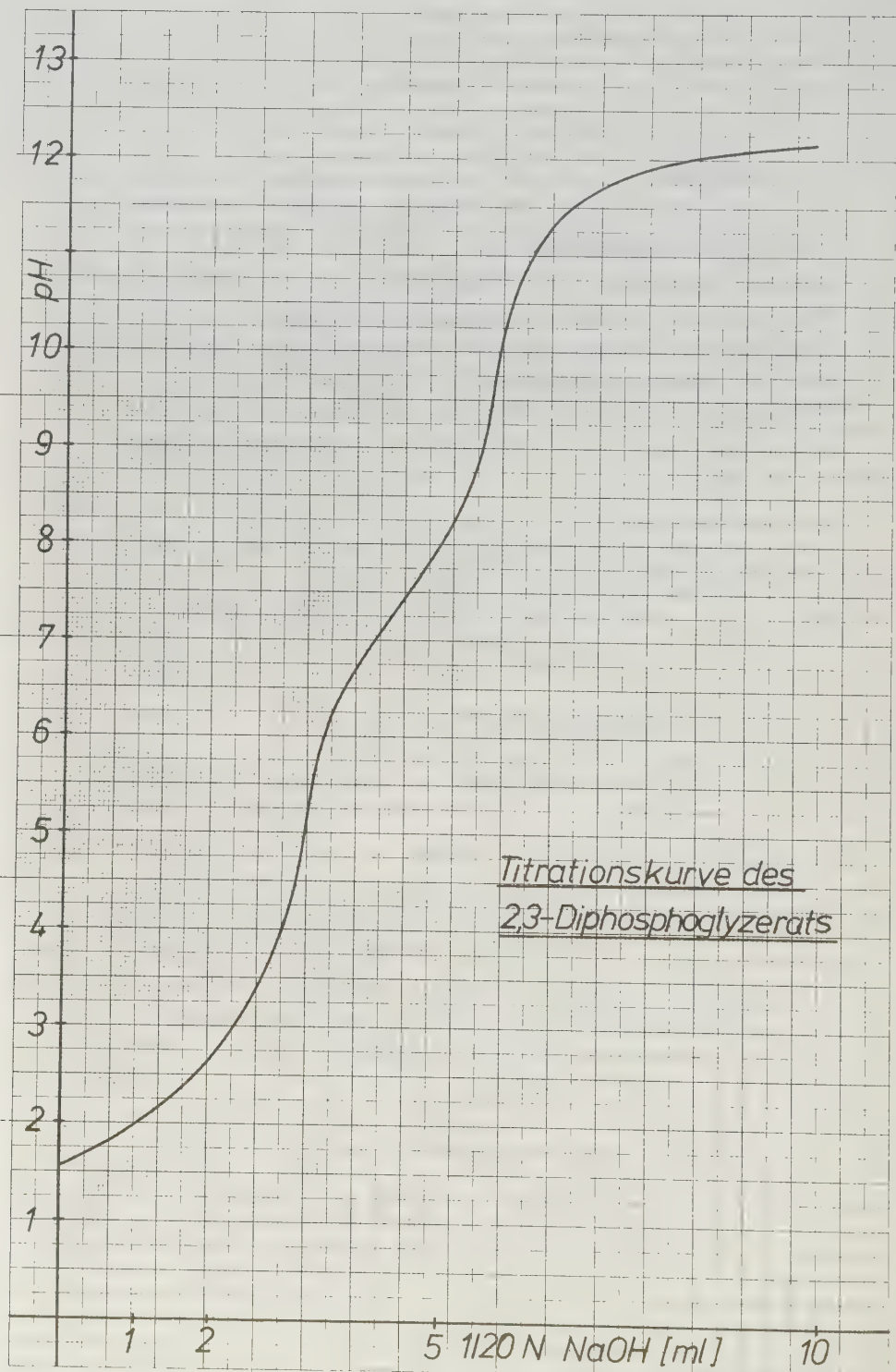
12. Greenberg, L.A., Lester, D., Haggard, H.W.: The reaction of hemoglobin with nitrite. *J. Biol. Chem.* 151 (1943), 665.
13. Jaffé, E. R., Hsieh, H.S.: DPNH-methemoglobin reductase deficiency and hereditary methemoglobinemia. *Sem. Hematol.* 8 (1971), 417.
14. Jänig, G.R., Gerber, G., Ruckpaul, K., Rapoport, S., Jung, F.: Interaction of haemoglobin with ions. (Thermodynamic data on binding of adenosin triphosphate to methaemoglobin.) *J. Biochem.* 17 (1970), 441.
15. Jonxis, I.H.P., Huisman, T.H.J.: A laboratory manual on abnormal hemoglobins. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburg, 1968, 38.
16. Jung, F., Kahl, R.: Über die Reaktion zwischen Hämoglobin und Natriumnitrit. *Acta biol. med. german.* 19 (1967), 853.
17. Jung, F., Remmer, H.: Über die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin. *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 206 (1949), 459.
18. Kiese, M.: Methemoglobinemia: A comprehensive treatise, CRC-Press, Cleveland 1974, p. 62.
19. Kleihauer, E.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten. Beiheft zum Archiv für Kinderheilkunde, 53. Heft, Enke Verlag, Stuttgart 1966.
20. Maeda, T., Imai, K., Tyuma, I.: Effects of 2,3-diphosphoglycerate on the oxygen equilibria of the half-cyanmet hybrid hemoglobins. *Biochemistry* 11 (1972), 3685.
21. Mansouri, A., Winterhalter, K.H.: Non equivalence of chains in hemoglobin oxidation. *Proc. Europ. Soc. Clin. Invest.* (1973), Abstract 183.
22. Mansouri, A., Winterhalter, K.H.: Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation and oxygen binding. Effect of organic phosphates. *Biochem.* 13 (1974), 3311.
23. Olsen, J.S., Gibson, Q.H.: The reaction of n-butyl isocyanid with human hemoglobin. II. The ligand-binding properties of the α - and β -chains within desoxyhemoglobin.

24. Ruckpaul, K., Rein, H., Ristau, G.R., Jung, F.: Interaction of hemoglobin with ions. Allosteric effects of the binding of anions. *Biochem. Biophys. Acta* 236 (1971), 211.
25. Versmold, H.: (1970) unveröffentlicht.
26. Versmold, H., Kohne, E., Riegel, K., Betke, K., Kleihauer, E.: Oxygen carrying function of blood in hereditary methemoglobinemia: Ambivalent effects of 2,3-diphosphoglycerate. in: Gerlach, G., Moser, K., Deutsch, E., Williams, W. (Herausgeber): *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes*. Georg Thieme, Stuttgart 1973, S. 171.
27. Versmold, H., Merkel, N., Riegel, K., Betke, K.: Oxidation kinetics of human oxyhemoglobins: Influence of 2,3-diphosphoglycerate. VIIth Internat. Berlin Symposium on Structure and Function of Erythrocytes, Berlin/GDR, (1973)
28. Versmold, H., Mittermüller, J., Betke, K. (1975), in Vorbereitung
29. Versmold, H., Riegel, K.: The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and the Hemoglobins F and A₁ at different concentrations of 2,3-diphosphoglycerate. *Pediat. Res.* (1973), Abstract, im Druck.
30. Versmold, H., Seifert, G., Riegel, K.P.: Blood oxygen affinity in infancy: The interaction of fetal and adult hemoglobin, oxygen capacity, and red cell hydrogen ion and 2,3-diphosphoglycerate concentration. *Respir. Physiol.* 18 (1973), 14.
31. Versmold, H., Ulmer, B., Riegel, K., Betke, K.: Influence of 2,3-diphosphoglycerate on the rate of oxidation of hemoglobin to methemoglobin. *Klin. Wschr.* 51 (1973), 93.

VII. Anhang

Titrationsskurve von 2,3-DPG

Da bei der Titration von 2,3-DPG auf pH 10,0, die zur Ermittlung der Molarität des chromatographierten 2,3-DPG notwendig ist, anfangs Schwierigkeiten auftraten, wurde eine Titrationsskurve erstellt. Durch sie sollten pH-Bereiche erkannt werden, in denen 2,3-DPG puffert. Dabei ergab sich folgende Kurve.



VIII. Abbildungen

- Abb. 1: NaNO_2 -Oxidation von Hb-A bei steigender 2,3-DPG-Konzentration
T : 25°C ; pO_2 : 140 torr; Nitrit : Häm = 10 : 1
- Abb. 3: NaNO_2 -Oxidation von Hb-F bei steigender 2,3-DPG-Konzentration
T : 25°C ; pO_2 : 140 torr; Nitrit : Häm = 10 : 1
- Abb. 4: NaNO_2 -Oxidation von Hb-A und Hb-F, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG
T : 37°C ; pO_2 : 140 torr; Nitrit : Häm = 10 : 1
- Abb. 5: NaNO_2 -Oxidation von Hb-A, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG
T : 25°C und 37°C ; pO_2 : 700 torr; Nitrit : Häm = 10 : 1
- Abb. 6: NaNO_2 -Oxidation von Hb-A-Hämolysaten, pH = 6,8
Wellenlänge : 630 nm
- Abb. 7: NaNO_2 -Oxidation von Hb-A, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG
T : 25°C ; pO_2 : 140 torr; Nitrit : Häm = 4 : 1
- Abb. 8: pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit der NaNO_2 -Oxidation von Hb-F
T : 25°C ; pO_2 : 140 torr; Nitrit : Häm = 10 : 1
- Abb. 9: Spontanoxidation von Hb-A, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG
T : 37°C ; pO_2 : 140 torr
- Abb. 10: Spontanoxidation von Hb-F, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG
T : 37°C ; pO_2 : 140 torr
- Abb. 11: Geschwindigkeitskonstanten der Spontanoxidation von Hb-A und Hb-F, ohne und mit 5 mM 2,3-DPG
halblogarithmisch; O_2 -Hb [%] gegen Zeit
T : 37°C ; pO_2 : 140 torr

Abb. 1

NaNO₂-Oxidation von Hb-A

T 25°C

pO₂ 140 torr

Nitrit: Häm = 10:1

100

Met-Hb [%]

50

— ohne 2,3-DPG
 - - - 5·10⁻⁷M 2,3-DPG
 5·10⁻⁶M 2,3-DPG
 - · - · 5·10⁻⁵M 2,3-DPG
 - - - 5·10⁻⁴M 2,3-DPG
 - - - 5·10⁻³M 2,3-DPG

12

24

60

120

t /sec

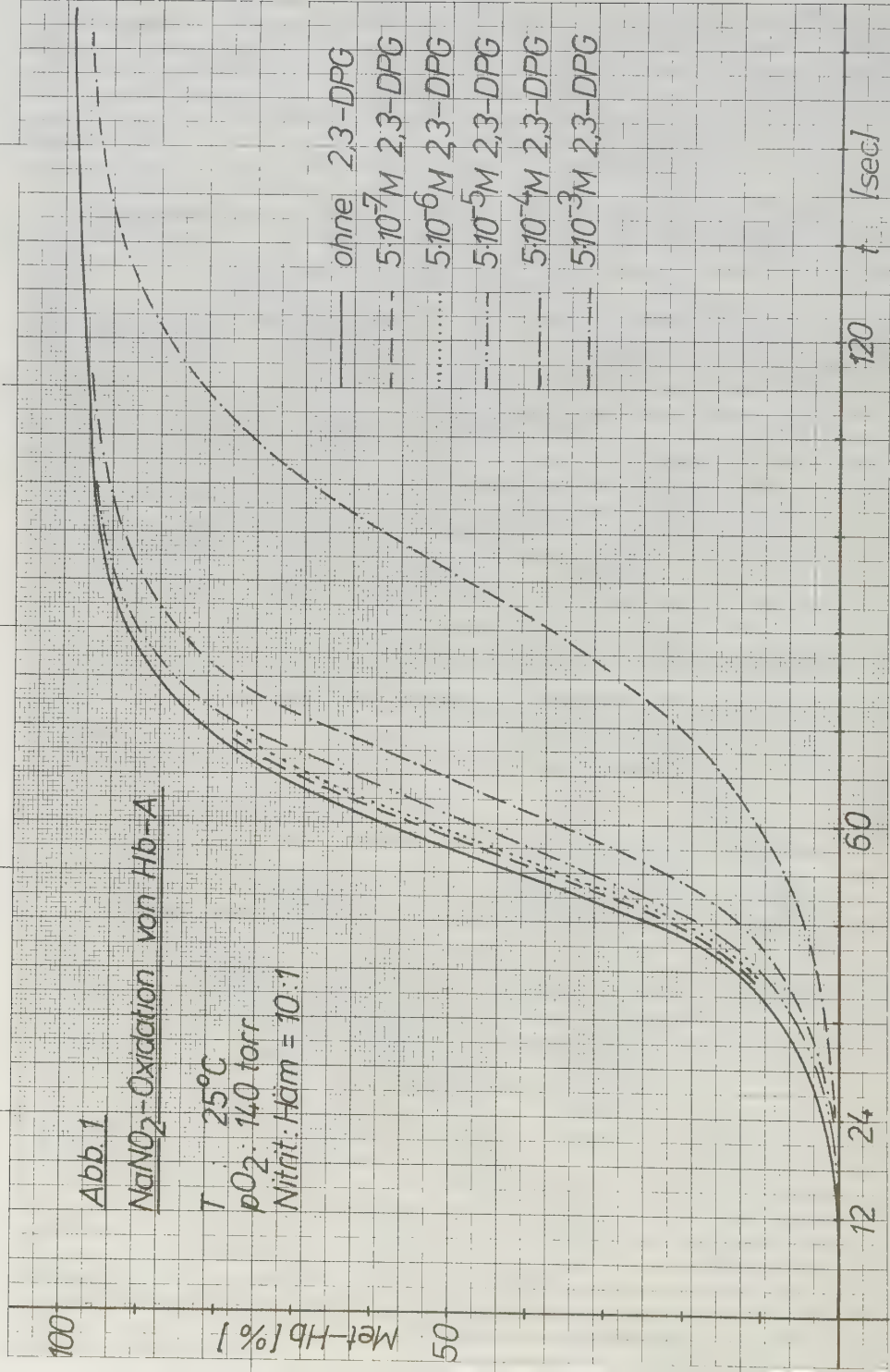


Abb. 3

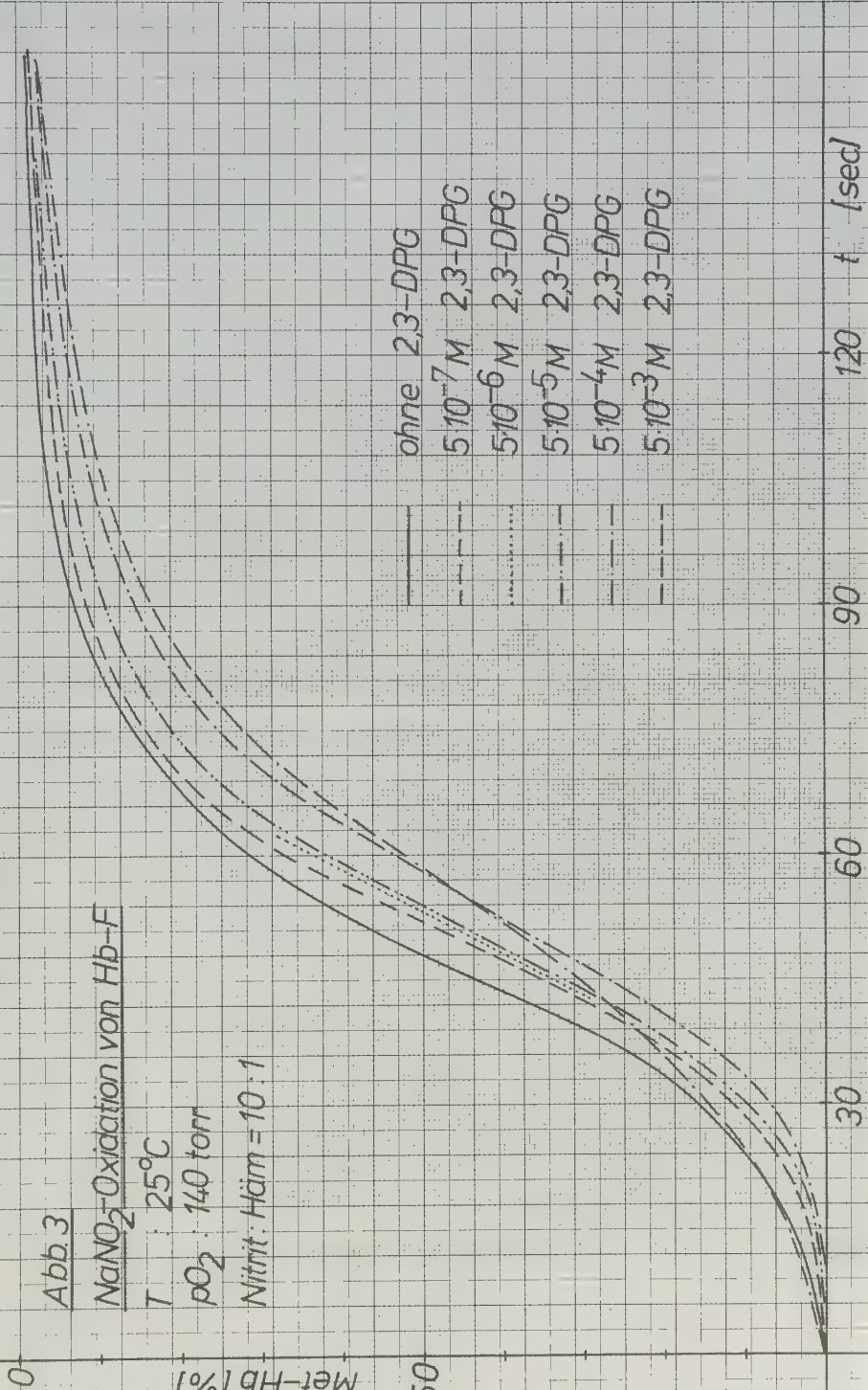
NaNO_2 -Oxidation von Hb-F

$T: 25^\circ\text{C}$

$p\text{O}_2: 140 \text{ torr}$

Nitrit: Häm = 10:1

—	ohne	2,3-DPG
- - -	$5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	2,3-DPG
· · ·	$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	2,3-DPG
- · -	$5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2,3-DPG
- - -	$5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	2,3-DPG
- - -	$5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	2,3-DPG



100

Met-Hb [%]

50

60

180

300

t [sec] 480

Abb. 4

NaNO₂-Oxidation von Hb-A und Hb-F

T 37°C

pO₂ 140 torr

Nitrit-Häm = 10 : 1

Hb-A, ohne 2,3-DPG

Hb-A, mit 5mM 2,3-DPG

Hb-F, ohne 2,3-DPG

Hb-F, mit 5mM 2,3-DPG

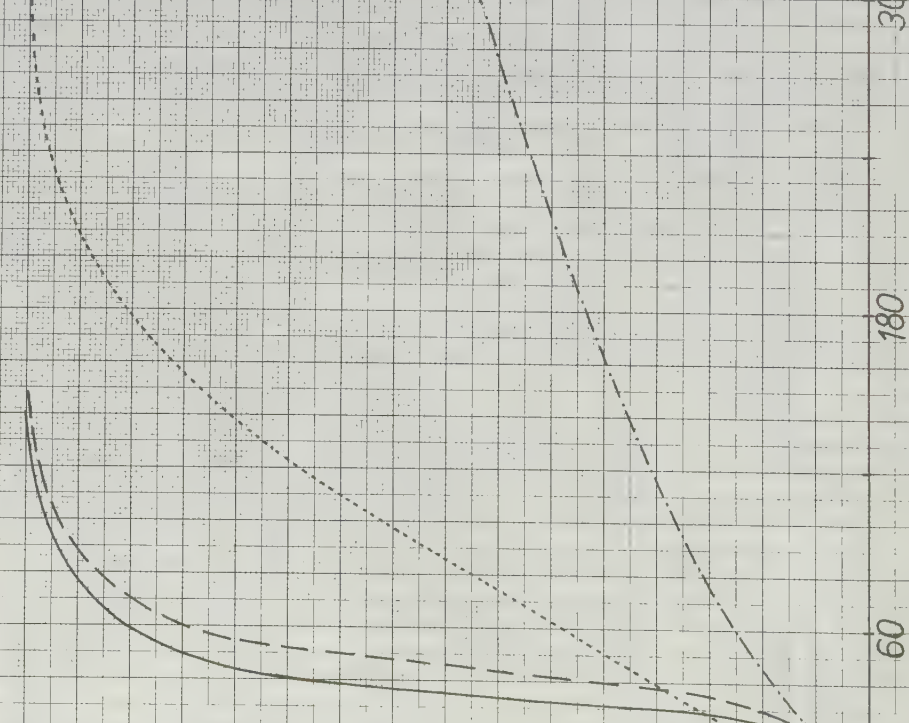


Abb. 5

NaNO₂-Oxidation

von Hb-A

T : 25°C, 37°C

pO₂ : 700 torr

Nitrit:Häm =

= 10:1

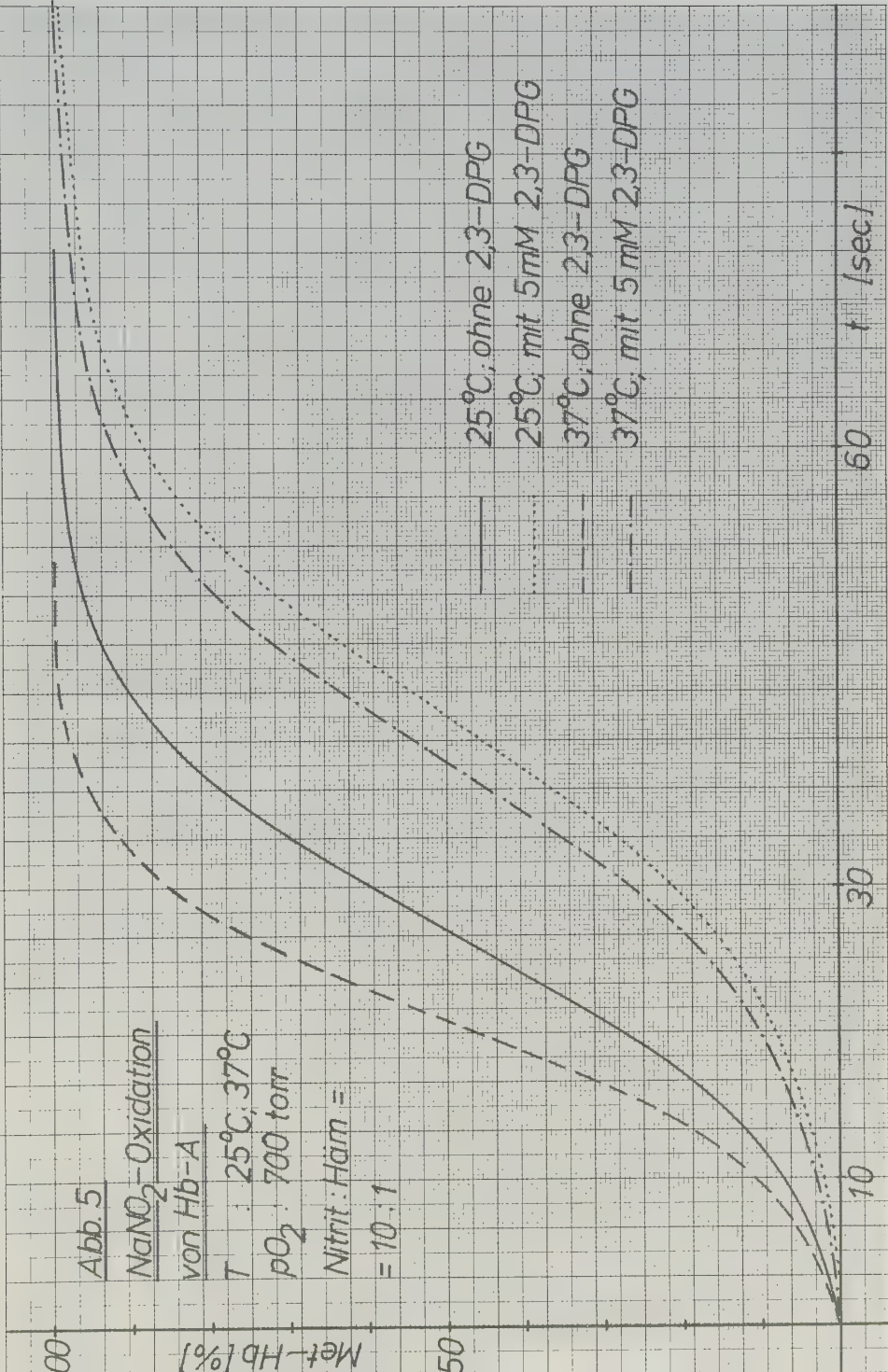
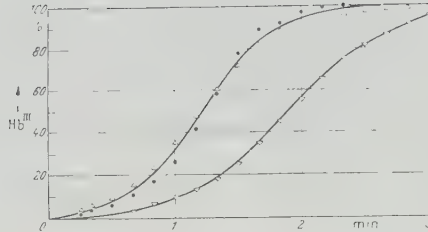


Abb. 6:

Wellenlänge, bei der
die Messungen durch-
geführt wurden: 630 nm



Oxydation von O_2Hb des erwachsenen Menschen durch Natriumnitrit.

pH 6,8, - ● einfaches Hämolsat gewaschener Erythrocyten

▲ durch Adsorption gereinigtes Hämolsat

◆ durch Adsorption und Dialyse gereinigtes Hämolsat.

Aus: Betke, K., Greinacher, I., Tietze, O.: Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Natriumnitrit.

Arch. exper. Path. und Pharmakol. 229 (1956), 220.

Abb. 7

NaNO₂-Oxidation von Hb-A

T : 25°C

pO₂ : 140 torr

Nitrit : Häm = 4 : 1

Met-Hb [%]

50

ohne 2,3-DPG

mit 5 mM 2,3-DPG

10

60

120

180

t [min]

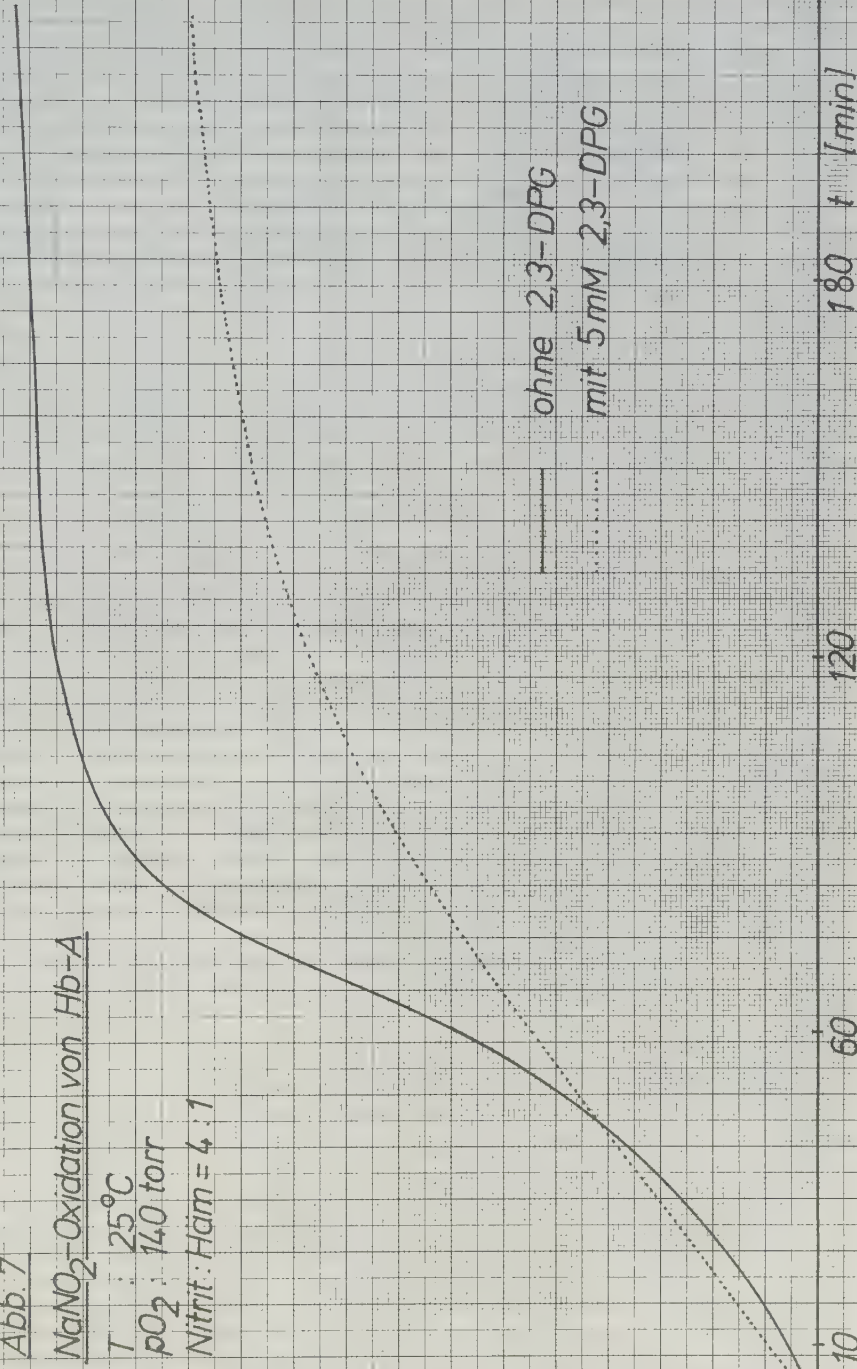


Abb. 8

pH-Abhängigkeit der Geschwin-
digkeit der NaNO_2 -Oxidation
von Hb-F

T : 25°C

$p\text{O}_2$: 140 torr

Nitrit : Häm = 10 : 1

$t_{1/2}$ [sec]

80

70

60

50

40

30

20

10

0

6,5

6,6

6,7

6,8

6,9

pH 7,0

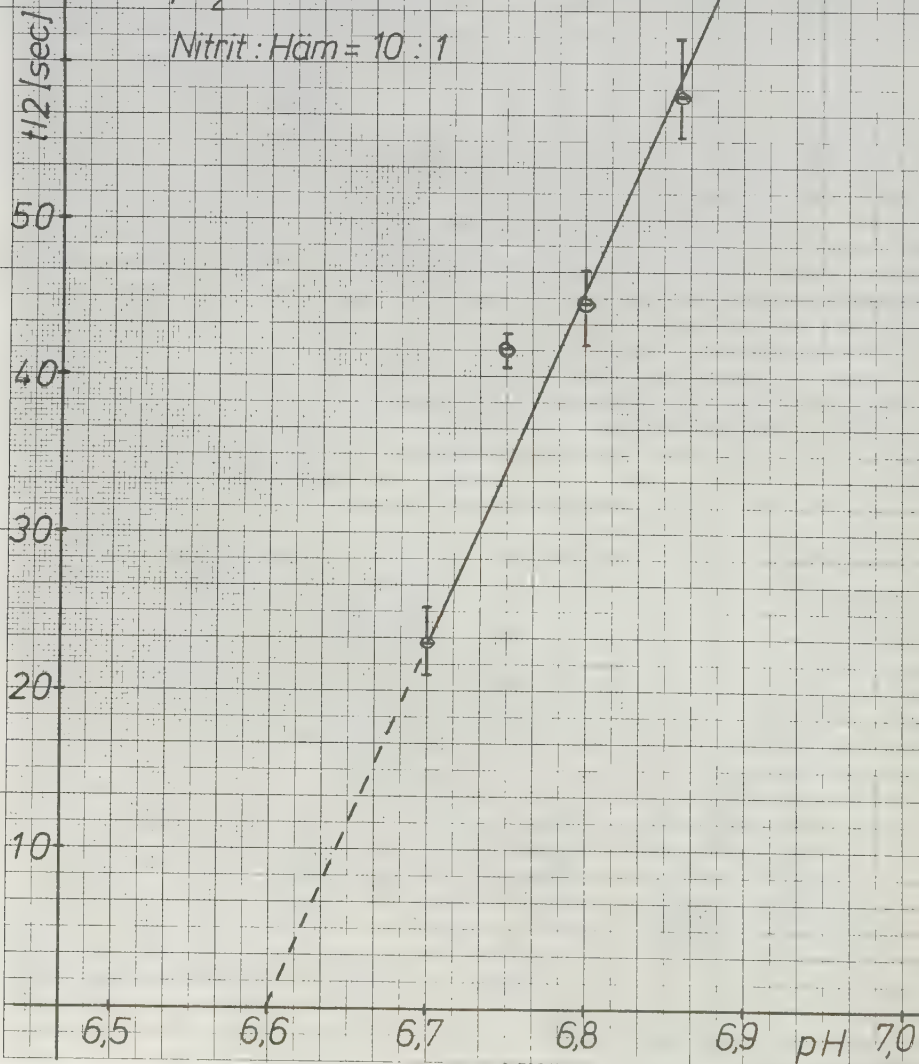


Abb. 9

Spontanoxidation von Hb-A

T : 37°C

$p\text{O}_2$: 140 torr

— ohne 2,3-DPG

- - - mit 5mM 2,3-DPG

• mit 35mM KCl

Met-Hb [%]

t [Stunden]

100

50

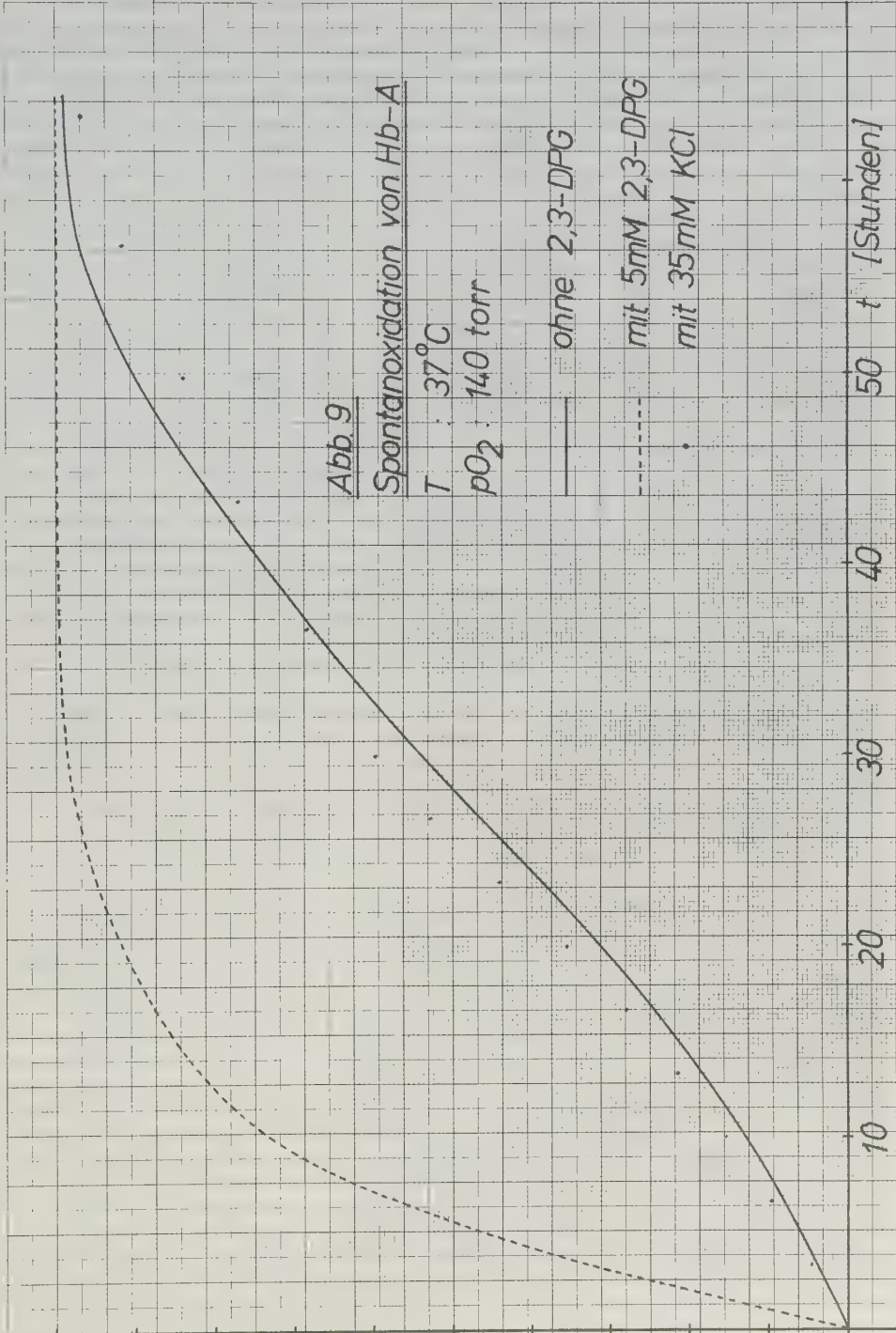
10

20

30

40

50



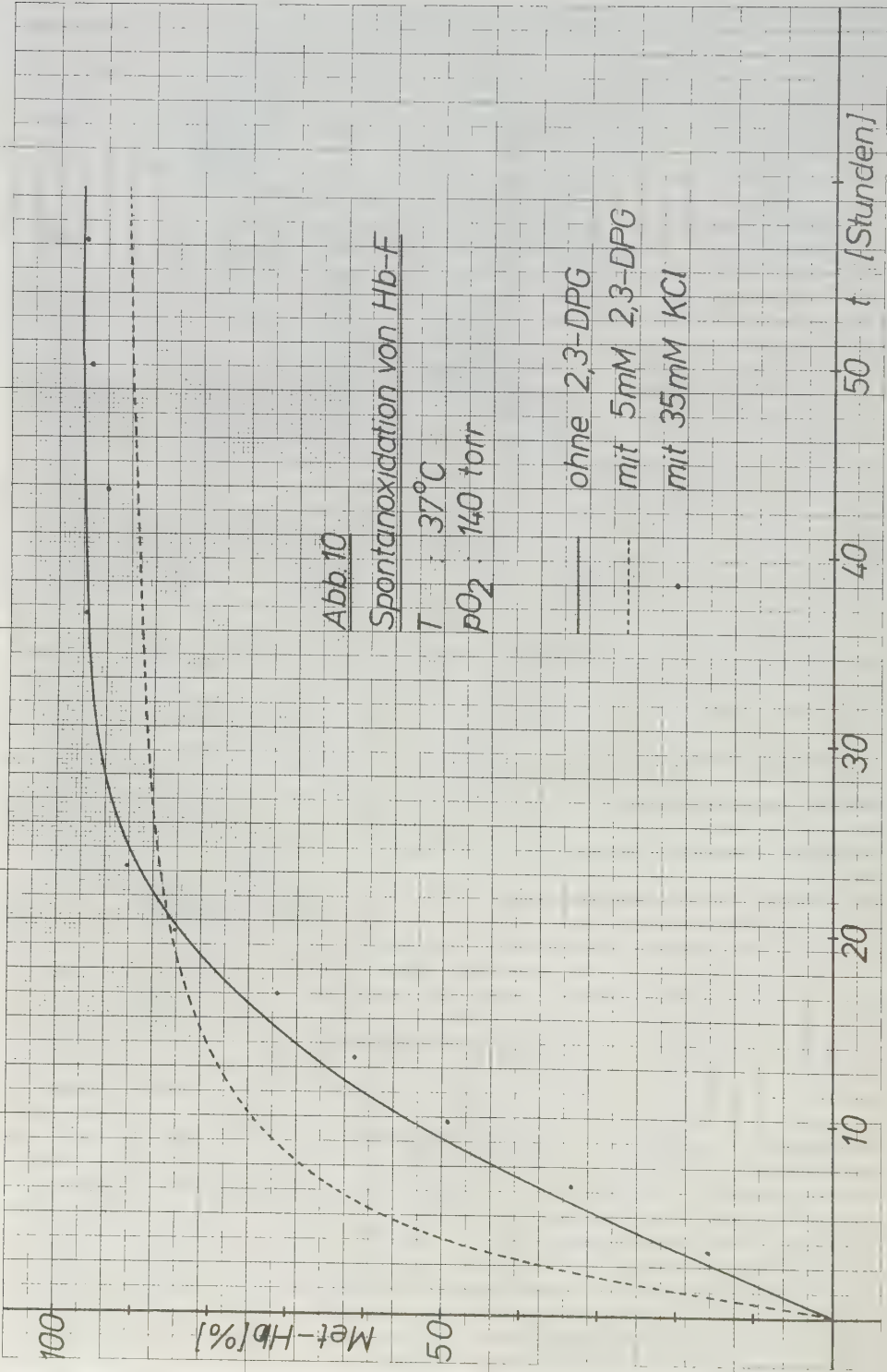


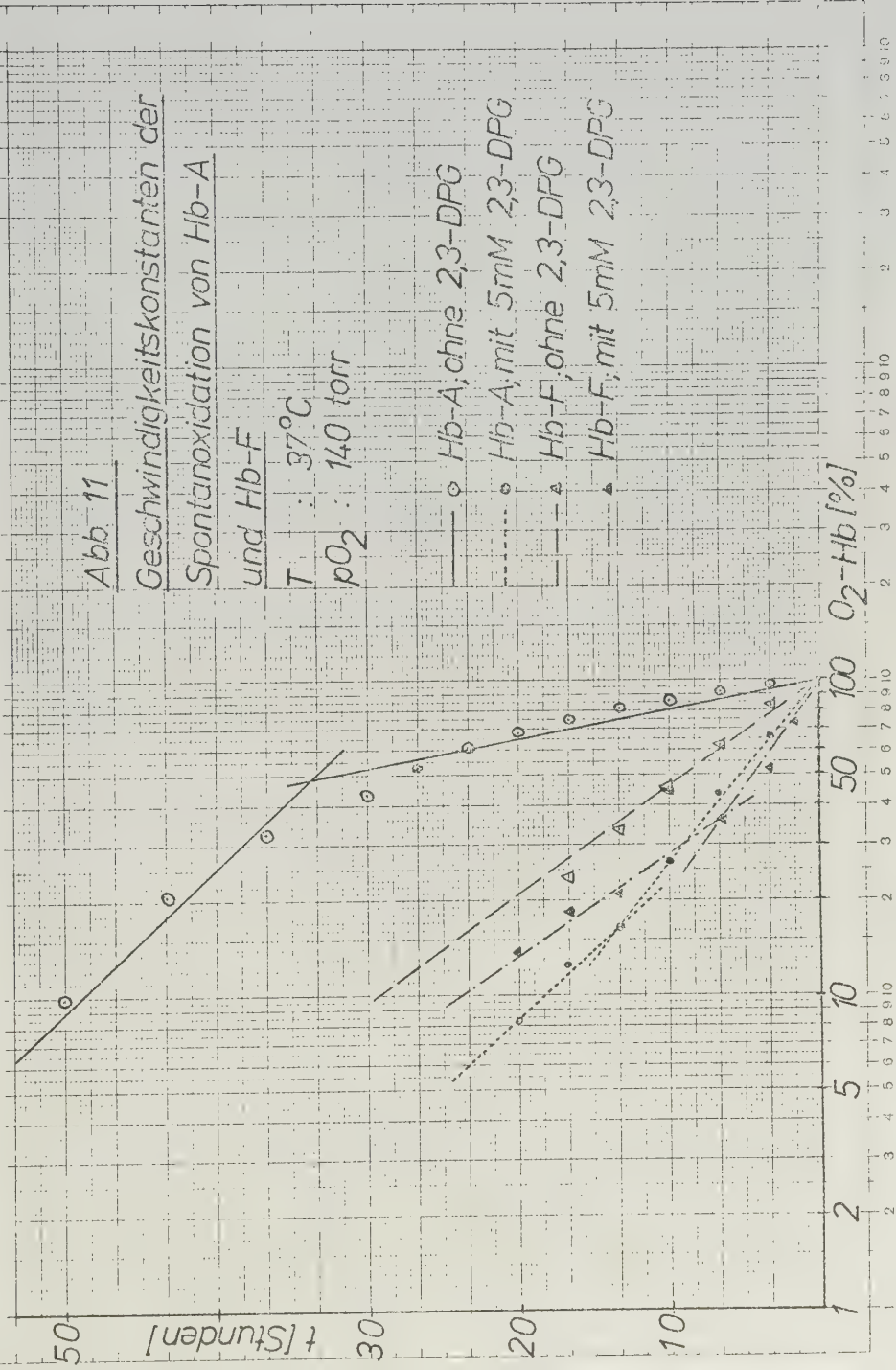
Abb. 11

Geschwindigkeitskonstanten der
Spontanoxidation von Hb-A
und Hb-F

$T : 37^{\circ}\text{C}$

$p\text{O}_2 : 140 \text{ torr}$

- Hb-A, ohne 2,3-DPG
- - -○- Hb-A, mit 5mM 2,3-DPG
- - -△- Hb-F, ohne 2,3-DPG
- - -△- Hb-F, mit 5mM 2,3-DPG



Ich danke der Kinderklinik der Universität München und Ihrem Direktor Herrn Prof. Dr. K. Betke für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Bereitstellung der Mittel für die Untersuchungen,

Herrn Prof. Dr. K. Riegel für das gestellte Thema, das mit eingehenderer Beschäftigung für mich immer interessanter wurde und für das Referat,

Herrn Dr. H. Versmold für seine stete Beratung und großzügige Hilfsbereitschaft, die wesentliche Voraussetzungen für das Gelingen der Arbeit waren,

Fräulein H. Windthorst für Ihre liebenswürdige und tatkräftige technische Hilfe.

Lebenslauf

Norbert Hans Friedrich Merkel

Geboren am 30. November 1947 in Bayreuth

Vater: Friedrich Merkel

Mutter: Christine Merkel, geb. Münch

Volksschule:

Schuljahr 1954/55	Jean-Paul-Volksschule Bayreuth
Sept. 1955 bis Jan. 1958	Evangelische Volksschule Günzburg/ Donau
Jan. 1958 bis Juli 1959	Evangelische Volksschule Freising

Gymnasium:

Schuljahr 1959/60	Domgymnasium Freising (Humanistisches Gymnasium mit Ober- realschule)
ab Schuljahr 1960/61	Josef-Hofmiller-Gymnasium Freising (Naturwissenschaftlich-mathematisches und neusprachliches Gymnasium)
1968	Abitur am naturwissenschaftlich-mathe- matischen Zweig des Josef-Hofmiller- Gymnasiums Freising

Studium:

WS 1968/69	Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Uni- versität München
SS 1969	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
SS 1971	Ärztliche Vorprüfung
Herbst 1974	Staatsexamen an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Uni- versität München

